



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Identificação das glicoproteínas da geléia real de
Apis mellifera L. por análise em MALDI-TOF MS**

Aluna: Renata Roland Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA - MG
2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Identificação das glicoproteínas da geléia real de *Apis mellifera* L. por análise em MALDI-TOF MS

Aluna: Renata Roland Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

**Dissertação de Mestrado
apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre
em Genética e Bioquímica,
ênfase em Bioquímica.**

UBERLÂNDIA-MG

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T266i Teixeira, Renata Roland, 1983-
 Identificação das glicoproteínas da geléia real de *Apis mellifera* L.
 por análise em MALDI-TOF MS / Renata Roland Teixeira. - 2007.
 57 f. : il.

 Orientador: Foued Salmen Espindola.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.

 1. Abelha - Teses. 2. Proteínas - Teses. I. Espindola, Foued Salmen.
 II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 595.799



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Identificação das glicoproteínas da geléia real de *Apis mellifera* L. por análise em MALDI-TOF MS

Aluna: Renata Roland Teixeira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola (Orientador)

Examinadores:

Prof. Dr. Mário Sérgio Palma

Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta

Data da Defesa: 28 /02 /2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Dedicatória

Na estrada da vida encontramos diversas curvas e algumas pessoas nos ajudam a segurar firme e seguir o caminho certo. O mestrado foi um tempo de muitas curvas e ninguém melhor do que a família para nos ajudar a vencer as barreiras e seguir em frente. Á vocês, minha querida família (Papai, mamãe, maninha e amore) dedico este meu trabalho e todo meu esforço.

Agradecimentos

À **Deus**, força presente em minha vida em todos os momentos, dando-me persistência e coragem para desafiar e descobrir meus próprios limites;

Aos meus pais, **Hugo Tormin Teixeira e Olívia Aparecida Roland**, pelo amor, dedicação, paciência e incentivo, pelo apoio emocional e financeiro, e pela imensa compreensão que tiveram em relação a minha ausência em muitos momentos. Enfim, agradeço por tudo que fazem e fizeram para que eu pudesse alcançar meus objetivos profissionais e pessoais;

À minha irmã, **Juliana Roland Teixeira**, que eu amo tanto e que esteve comigo compartilhando de um modo ou de outro todos os momentos pelos quais passei... alegrias, tristezas, angústias, risos e palhaçadas. Jujuba, muito obrigada pelo seu amor, carinho e companheirismo;

Ao **Jean**, meu marido, namorado e amigo, com o qual compartilhei minhas dúvidas, incertezas e alegrias. Amore, muito obrigada pelo amor, carinho, conselho e imensa paciência;

Ao **Prof. Dr. Foued Salmen Espindola**, pela confiança e oportunidade de aprender, persistir e conquistar;

Aos **técnicos**, por facilitarem a minha formação auxiliando da melhor forma possível;

À **Universidade Federal de Uberlândia e seus funcionários**, por me auxiliarem na minha formação acadêmica;

Ao **Instituto de Genética e Bioquímica**, pelos recursos e estrutura fornecida para a realização deste trabalho;

À **CAPES**, pela bolsa de mestrado que muito me auxiliou na realização deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa**, pela parceria que proporcionou o desenvolvimento deste trabalho;

À **Ms. Liudy Garcia Hernández**, por me ajudar na obtenção e análise dos resultados e não medir esforços para a realização de parte deste trabalho;

Aos **curiscos eternos**, Ana Clara, Ana Flávia, Andréa, Carol, Cláudia, Letícia, Lorena, Luciana, Lyvia, Neire, Simone e Vilma pelas risadas, apoio e colaboração que tornaram nossos dias mais alegres, divertidos e produtivos;

À amiga **Luciana Karen Calábria**, com a qual tive a felicidade de conviver por estes anos e aprender muito. Passamos por muitas coisas juntas, alegrias, tristezas, dúvidas, sorrimos e choramos, agradeço por me ajudar tanto no profissional como no pessoal e espero que esta parceria perdure por mais vários anos;

Aos **amigos e companheiros do LABIBI e LABES** que sempre estiveram de braços abertos e prontos para ajudar;

Àqueles **antigos membros do Labibi**, que apesar de não estarem presentes no dia-a-dia com certeza deixaram um pouco de si através daqueles que ficaram;

E a todos que de alguma forma me auxiliaram na realização deste trabalho!

Muito Obrigada!

Renata Roland Teixeira

Lista de Abreviaturas

µg	microgramas
µL	microlitros
1D - PAGE	Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida
2D - PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
Apa-1	Apalbumina-1
Apa-2	Apalbumina-2
Apa-3	Apalbumina-3
Apa-4	Apalbumina-4
Apa-5	Apalbumina-5
Apa-6	Apalbumina-6
Apa-7	Apalbumina-7
BLASTP	Blast de proteína-proteína
BSA	Soroalbumina bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
ConA	Concanavalina A
Da	Dalton
DTT	Ditiotreitol
Glcα	Glicose
GlcNAcα1	N-acetilglicosamina
GR	Geléia real
GRB	Geléia real brasileira
GRC	Geléia real chinesa
kDa	Quilodaltons
L	Litro
M	Molar
MALDI-TOF MS	Espectrometria de massa por tempo de voo com desorção à laser e ionização assistida por matriz

Man α 1	Manose
mM	Milimolar
Mr	Massa molecular relativa
MRJPs	<i>Major Royal Jelly Protein</i>
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI _{nr}	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramas
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio monohidratado
°C	Graus Celsius
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial hidrogeniônico
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i>
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorido
PTMs	Modificações pós-traducionais
rpm	Rotações por minuto
S ₁	Fração sobrenadante
SDS	Dodecil sulfato de sódio
HCl	Ácido clorídrico
WSPs	<i>Water soluble proteins</i>

Lista de aminoácidos

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Ácido aspártico
Lys	Lisina
Ser	Serina
Thr	Treonina

Lista de Figuras

Capítulo único

Figura 01. Perfil eletroforético das frações sobrenadante e eluído das amostras de geléia real brasileira (GRB) e geléia real chinesa (GRC)..... 31

Figura 02. Perfil cromatográfico das glicoproteínas de geléia real brasileira (GRB) e geléia real chinesa (GRC) eluídas da coluna de concanavalina A.....32

Anexos

Figura 03. Análise de bioinformática da glicoproteína (B1) de GRB..... 40

Figura 04. Análise de bioinformática da glicoproteína (B2) de GRB..... 41

Figura 05. Análise de bioinformática da glicoproteína (B3) de GRB..... 42

Figura 06. Análise de bioinformática da glicoproteína (B4) de GRB..... 43

Figura 07. Análise de bioinformática da glicoproteína (B5) de GRB..... 44

Figura 08. Análise de bioinformática da glicoproteína (B7) de GRB..... 45

Figura 09. Análise de bioinformática da glicoproteína (B9) de GRB..... 46

Figura 10. Análise de bioinformática da glicoproteína (C1) de GRC..... 47

Figura 11. Análise de bioinformática da glicoproteína (C2) de GRC..... 48

Figura 12. Análise de bioinformática da glicoproteína (C3) de GRC..... 49

Figura 13. Análise de bioinformática da glicoproteína (C4) de GRC..... 50

Figura 14. Análise de bioinformática da glicoproteína (C5) de GRC.....	51
Figura 15. Análise de bioinformática da glicoproteína (C6) de GRC.....	52
Figura 16. Análise de bioinformática da glicoproteína (C7) de GRC.....	53
Figura 17. Análise de bioinformática da glicoproteína (C8) de GRC.....	54
Figura 18. Análise de bioinformática da glicoproteína (C9) de GRC.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 01. Identificação das glicoproteínas da geléia real brasileira (B1 – B9) e geléia real chinesa (C1 – C12) da abelha <i>Apis mellifera</i>	33
---	----

Sumário

Introdução Geral.....	2
A abelha <i>Apis mellifera</i>	2
Produtos da colméia.....	3
Pólen e mel.....	3
Geléia real.....	5
Modificações pós-traducionais.....	7
Glicosilação.....	7
Referências Bibliográficas.....	10
 <u>Capítulo único: Identificação das glicoproteínas da geléia real de <i>Apis mellifera</i> L. por análise em MALDI-TOF MS.....</u>	
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Introdução.....	19
Matérias e Métodos.....	22
Material Biológico.....	22
Cromatografia de afinidade.....	22
Detecção e Dosagem de proteína.....	23
<i>Peptide mass fingerprint</i> (PMF).....	23
Identificação de proteínas.....	24
Resultados e Discussão.....	25
Referências Bibliográficas.....	34
Anexos.....	40
Análise de bioinformática dos polipeptídeos de geléia real brasileira (GRB) isolados por cromatografia de afinidade de ConA e eletroforese SDS-PAGE 1D.....	40
Análise de bioinformática dos polipeptídeos de geléia real chinesa (GRC) isolados por cromatografia de afinidade de ConA e eletroforese SDS-PAGE 1D.....	47

Introdução Geral

A Abelha *Apis mellifera*

A *Apis mellifera* L. é uma das espécies de abelha que desperta grande interesse para a apicultura devido à produção de mel, geléia real (GR), própolis e cera, bem como por sua grande importância na agricultura como excelente polinizadora (Giorgini and Gusman *et al.*, 1972). Essas abelhas alimentam-se de néctar, pólen e GR, e vivem em colônias com cerca de 20.000 indivíduos divididos em três castas: rainha, zangão e operárias (Winston, 1979).

Na colônia, a rainha tem como principais funções a oviposição, através de um ferrão modificado em ovipositor, e a produção de um feromônio que inibe a reprodução das operárias. Cada colônia apresenta somente uma rainha que se alimenta exclusivamente com GR (Winston, 1979).

O zangão, com expectativa de vida entre 20 a 40 dias, tem como principal função fecundar a rainha e, para isso, exibe intensa adaptação comportamental e morfológica (Michener, 1944). Além disso, o zangão não participa da divisão de trabalho na colônia (Giray and Robinson, 1996).

As operárias podem ser caracterizadas conforme a função exercida dentro da colônia (Winston, 1979). Nos primeiros dias de vida, as abelhas operárias nutridoras executam serviços de faxina e, quando as glândulas que produzem GR já estão desenvolvidas, trabalham como nutrizes, alimentando as larvas. Quando começam a produzir cera, estão aptas a assumir tarefas como a construção dos favos e, por último, quando desenvolvem as glândulas do veneno e produtoras de odores, as operárias campeiras exercem funções de guarda, sinalização e forrageamento (Winston, 1979). As operárias são anatomicamente estéreis e criam a prole do membro dominante da colônia, a abelha rainha (Hartfelder, 2000).

Tipicamente, nas abelhas operárias nutridoras que possuem uma semana de vida, a glândula hipofaríngea localizada na cabeça produz a enzima invertase, utilizada no processamento do néctar em mel. Quando as abelhas completam, aproximadamente, duas semanas de vida, essa glândula está completamente desenvolvida nas abelhas nutridoras, e na terceira semana, a

glândula mostra a atividade primária da invertase (Maurizio, 1965; Simpson *et al.*, 1968), possibilitando o processamento do mel. Entretanto, nas abelhas campeiras, com duas a três semanas de vida, glândula hipofaríngeal apresenta-se reduzida e a glândula do veneno já produz uma quantidade máxima de veneno, possibilitando o forrageamento e a guarda da colméia (Winston, 1979).

Produtos da colméia

Pólen e Mel

A alimentação das castas da abelha *A. mellifera*, constituída de pólen e mel, ocorre de forma diferencial, sendo importante para a produção de GR e o processamento do mel. Além disso, as abelhas alimentam-se com GR, a qual está associada à plasticidade fenotípica e ao desenvolvimento dessa abelha (Camargo e Machado, 1972).

Nas abelhas operárias, essa alimentação é constituída de uma mistura de pólen e mel, sendo fundamental para a síntese de GR, cera e outras substâncias necessárias para a manutenção da colméia (Camargo e Machado, 1972). A digestão e o metabolismo do pólen, consumido por essas abelhas, é importante para a liberação da matéria necessária para a produção de GR. Além disso, esse consumo de pólen está relacionado com o aumento da expectativa de vida das abelhas, com o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeais, dos ovários das abelhas recém emergidas e do corpo adiposo (Camargo e Machado, 1972).

Da mesma forma, os zangões alimentam-se de pólen e mel, apresentando assim as mesmas características decorrentes dessa alimentação. Porém, por não possuírem glândulas hipofaríngeais, não secretam GR ou outros produtos da colméia (mel ou cera), os quais requerem enzimas secretadas por essas glândulas para o seu processamento (Camargo e Machado, 1972).

O mel é produzido principalmente a partir do néctar, um líquido com açúcares dissolvidos secretado por nectários florais das plantas (Lima, 2002). O néctar é coletado das flores pelas abelhas e transformado por meio de processos físico-químicos (evaporação da água e adição de enzimas), originando o mel (Komatsu *et al.*, 2002). A composição do mel de diferentes floradas varia de

acordo com o néctar produzido por cada espécie vegetal (Camargo e Machado, 1972).

Açúcares e água representam os principais constituintes químicos do mel (> 95%) enquanto que proteínas, flavonóides e aromas, pigmentos, vitaminas, aminoácidos livres e numerosos compostos voláteis constituem os menores componentes. Essa pequena porcentagem de toda composição é o principal responsável pelas propriedades organolépticas e nutricionais do mel (Cordella *et al.*, 2003).

O mel contém proteínas apenas em pequenas quantidades com uma média de 0.7% (Simúth *et al.*, 2004). As proteínas presentes no mel são provenientes da abelha e também das plantas (pólen e néctar). Dentre essas proteínas, as enzimas são os componentes mais importantes já que representam uma parte vital no processo bioquímico do mel. Várias enzimas como a glucosidase, a glucose oxidase e a amilase são componentes regulares do mel (Simúth *et al.*, 2004). Estudos revelam que pelo menos 19 bandas protéicas foram detectadas por coloração em prata do gel de poliacrilamida (SDS - PAGE) em amostras de méis de plantas de diferentes origens (Simúth *et al.*, 2004).

Comercializado tanto *in natura* quanto em diversas formas industrializadas, o mel é um dos produtos da colméia que possui maior atenção comercial devido ao seu consumo sem alterações e suas múltiplas aplicações como constituinte de alimentos (Baroni *et al.*, 2002). Atualmente, o mel está sendo utilizado nos alimentos como adoçante natural e também como medicamento. Recentemente, foi descoberto que 1% de mel estimula a liberação de TNF- α em monócitos humanos. Acredita-se que as abelhas *A. mellifera* secretam proteínas fisiologicamente ativas na GR durante a produção do mel (Simúth *et al.*, 2004).

A PPGR-1 é a proteína com maior probabilidade de estar presente nos produtos da abelha, já que esta foi detectada na glândula hipofaríngea de abelhas operárias. Essa proteína, que apresenta peso molecular de 55 kDa, é a mais abundante da GR representando 48% do total de proteínas hidrossolúveis (Simúth *et al.*, 2004). Segundo Simúth (2001), a PPGR-1 pertence à família de proteínas semelhantes à albumina, sendo por isso denominada como apalbumina-1 (Apa-1).

Até então, as únicas proteínas conhecidas, secretadas pelas abelhas durante o processamento do mel eram as enzimas necessárias para a conversão do néctar em mel. Entretanto, a partir da descoberta de que o mRNA codificante da Apa-1 está presente em amostras de glândulas hipofaringeais de operárias simultaneamente com o mRNA de α -glucosidase, uma enzima que catalisa a transformação da sacarose do néctar em frutose e glicose, Simúth *et al.* (2004) sugeriram que a Apa-1 possivelmente é uma proteína secretada pelas glândulas hipofaringeais de operárias no mel e no pólen, durante o processamento do mel.

O mel é processado a partir de uma composição enzimática secretada pelas glândulas hipofaringeais, as quais também participam na síntese de GR. Simúth *et al.* (2004) utilizando anticorpos policlonais contra as proteínas hidrossolúveis (WSPs) da GR e/ou anticorpos policlonais contra a Apa-1 verificaram a presença de proteínas da GR (principalmente a de 55kDa) em amostras de mel de diversas floradas e em pólen de diferentes plantas, coletados e manipulados pelas abelhas (pólen *pellet*). Deste modo, sugeriu-se que essa proteína pode ser usada na avaliação biológica e valorização do mel e do pólen.

Geléia real

A geléia real (GR) é secretada a partir das glândulas hipofaringeais e mandibulares das abelhas operárias jovens, principalmente entre a sexta e décima segunda semana de vida (Nagai and Inoue, 2004; Scarselli *et al.*, 2005). Esse produto da colméia é o principal alimento da rainha desde seu estágio larval, sendo importante para a diferenciação das castas e pelas características exclusivas da rainha como o aumento da massa corporal, longevidade e desenvolvimento de estruturas relacionadas à reprodução (Kubo *et al.*, 1996; Ohashi *et al.*, 1997).

Na constituição química da GR encontram-se vários compostos como água (60 a 70%), proteínas (12 a 15%), açúcares (10 a 16%), lipídeos (3 a 6%, principalmente o 10-hidroxi-2-decenóico), minerais (2 a 3%, como o ferro e cálcio) e vitaminas (principalmente tiamina, niacina e riboflavina) (Albert *et al.*, 1999; Schmitzová *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, as proteínas da GR vêm sendo estudadas, identificadas e caracterizadas. Dentre essas se destacam as proteínas hidrossolúveis (WSPs). As WSPs melhor caracterizadas são denominadas de principais proteínas da GR (PPGRs - Apalbuminas). As apalbuminas representam 82% do total das WSPs e cerca de 90% do total de proteínas da GR (Schmitzová *et al.*, 1998). A família das apalbuminas consiste de cinco membros principais: Apa-1 (55 kDa), Apa-2 (49 kDa), Apa-3 (60-70 kDa), Apa-4 e Apa-5 (77-87 kDa) (Ohashi *et al.*, 1997; Schmitzová *et al.*, 1998; Simúth, 2001). Albert and Klaudiny (2004) relataram a presença de outras três apalbuminas (Apa-6 a Apa-8) em bibliotecas de cDNA de cérebro de *A. mellifera*.

A composição da GR de abelhas européia e africanizada foi analisada a partir de abordagem proteômica e identificaram-se diferentes isoformas de Apa-1 a Apa-5, essas apresentaram heterogeneidade em termos de massa molecular e ponto isoelétrico (Sano *et al.*, 2004). Posteriormente, Santos *et al.* (2005) verificaram, em S1 da glândula hipofaringeal, 61 diferentes polipeptídeos dos quais 27 são isoformas das Apa-1 a Apa-8, cinco são proteínas relacionadas com a síntese de carboidratos e metabolismo de óxido-redução de substratos energéticos, uma proteína relacionada com o acúmulo de ferro no corpo da abelha e uma proteína que pode regular o oligômero da Apa-1.

A GR tem sido mundialmente utilizada como suplemento alimentar associado à longevidade e está presente na composição de cosméticos em vários países (Kamakura *et al.*, 2001). Além disso, apresenta diversas atividades biológicas e farmacológicas, dentre as quais se destacam a atividade vasodilatadora e hipotensora (Shimoda *et al.*, 1978; Tokunaga *et al.*, 2004), regulatória no controle do desenvolvimento da abelha (Malekova *et al.*, 2003) e na modulação de respostas imunes (Okamoto *et al.*, 2003), atividade anti-hipercolesterolêmica (Nakajin *et al.*, 1982), atividade antiinflamatória podendo atuar na inibição da produção de citocinas próinflamatórias (Kohn *et al.*, 2002), atividade bactericida (Klaudiny *et al.*, 2005), antitumoral (Tamura *et al.*, 1987), antifadiga (Kamakura *et al.*, 2001) e antioxidante (Takeshi *et al.*, 2001).

Modificações pós-traducionais

As modificações pós-traducionais (PTMs) como fosforilação, acetilação e glicosilação definem a função e a plasticidade estrutural das proteínas, a partir da modulação da dinâmica e interações macromoleculares (Jensen, 2006). Recentemente o estudo das PTMs das proteínas tem sido interesse de comunidades de pesquisas biológicas e biomédicas, já que as modificações específicas nas proteínas regulam além de funções individuais, a atividade e a estabilidade de todas as proteínas, influenciando nas interações moleculares (Jensen, 2006).

O perfil das PTMs das proteínas constituem um código molecular que irá determinar a conformação protéica, localização celular, interações macromoleculares e atividades da proteína, dependendo do tipo de célula, de tecido, de espécie e das condições externas. As PTMs aumentam a diversidade de proteínas durante a síntese e secreção, além de alterar as propriedades físico-químicas e a massa molecular dessas proteínas (Jensen, 2006).

Nos estudos proteômicos das PTMs existe uma tendência em combinar tecnologias de separação e análise para conseguir mais especificidade, seletividade e sensibilidade. Desta forma, alguns métodos de extração protéica, enriquecimento por cromatografia de afinidade e separação eletroforética associados com a determinação da massa dos peptídeos e a sequência de aminoácidos garantem o alto desempenho da espectrometria de massa (Bauer and Kuster, 2003).

Glicosilação

As PTMs são sítio-específicas, estão localizadas em um resíduo de aminoácido específico da proteína, geralmente em uma sequência particular denominada *motif* (sequon). Existem dois tipos principais de glicosilação de proteínas, a *N*-glicosilação, onde o oligossacarídeo está ligado a um resíduo de asparagina e a *O*-glicosilação, onde o oligossacarídeo pode estar ligado a uma serina, treonina ou tirosina (Hitchen and Dell, 2006).

A primeira indicação de que a proteína pode estar glicosilada é geralmente uma migração diferenciada no gel, já que a glicosilação aumenta a massa molecular relativa da proteína (Hitchen and Dell, 2006). Para um estudo detalhado da glicosilação da proteína, a purificação por cromatografia é geralmente utilizada para isolar material suficiente para análise (Bauer and Kuster, 2003). As chances de detecção e caracterização da proteína são aumentadas com uma quantidade de material detectada por Coomanssie, deste modo, a coloração com Coomanssie é a mais indicada já que outras colorações podem interferir na análise subsequente da glicana (Hitchen and Dell, 2006).

Além disso, a disponibilidade de lectinas que selecionam especificamente classes de *N*-glicanas tem sido explorada para a caracterização da *N*-glicosilação (Sparbier *et al.*, 2005). A concanavalina A (conA) é uma lectina de feijão (*Canavalia ensiformis*) com alta seletividade, que se liga a manose e/ou glicose das *N*-glicanas de estrutura de carboidratos do tipo alta manose (Piñero-Rodriguez *et al.*, 2004; Ballerstadt *et al.*, 2006). A cromatografia de conA acoplada a eletroforese de gel bidimensional vem sendo bastante utilizada para o estudo das proteínas diferentemente expressas (Durham and Regnier, 2006).

A glicosilação de proteínas é importante para o reconhecimento e comunicação celular (Jensen, 2006). Os carboidratos têm múltiplas funções quando ligados às proteínas como a regulação do tráfego intracelular de proteínas para a manutenção da estabilidade estrutural, proteção contra proteólise e ligantes de receptores para proteínas no tráfego celular. Um exemplo disso é que a função de algumas proteínas como as citocinas e outras moléculas de sinais extra-celulares são afetadas pela glicosilação (Meri and Baumann, 2001).

A glicosilação de proteínas e a glicoproteômica são de grande interesse para o diagnóstico e terapia biomédica devido à relação entre o nível de glicosilação, tipo e o estado de saúde da célula (Meri and Baumann, 2001). Em um típico experimento de glicoproteômica, a partir de um complexo protéico separado por gel SDS-PAGE 1D, a banda da proteína purificada é excisada do gel, enzimaticamente digerida em peptídeos, lavada e analisada por espectrometria de massa (MS) (Bauer and Kuster, 2003). A massa molecular do peptídeo e a sequência são simultaneamente buscadas contra sequências protéicas no banco de dados para a identificação da proteína (Jensen, 2006). Os

peptídeos com massa que não coincidiram podem ser selecionados para experimentos MS/MS com o objetivo de obter informações sobre a sequência, a partir da qual será possível identificar qualquer peptídeo que possa estar glicosilado (Hitchen and Dell, 2006).

Referências Bibliográficas

Albert, S. and Klaudiny, J. (2004) The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identifications of new members in the EST library. *Journal Insect Physiology* In Press. v. 50. p. 51-50.

Albert, S.; Bhattacharya, D.; Klaudiny, J.; Schmitzová, J.; Simúth, J. (1999) The family of major royal jelly proteins and its evolution. *Journal Molecular Evolution*. v. 49. p. 290-297.

Ballerstadt, R.; Evans, C.; McNchols, R.; Gowda, A. (2006) Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. *Biosensors and Bioelectronics*. doi: 10.1016/j.bios.2006.01.008.

Baroni, M. V.; Chiabrando, G. A.; Costa, C.; Wunderlin, D. A. (2002) Assessment of the floral origin of honey by SDS-Page Immunoblot techniques. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 50. p. 1362-1367.

Bauer A. and Kuster, B. (2003) Affinity purification-mass spectrometry: Powerful tools for the characterization of protein complexes. *European Journal of Biochemistry*. v. 270. p. 570-578.

Camargo, J. M. F. e Machado, J. O. (1972) Alimentação em *Apis* e composição da geléia real, mel e pólen. In: Camargo, J. M. F., *Manual de Apicultura*. Ed. Agronômica Ceres, Brasil. p. 117-142.

Cordella, C. B. Y.; Militão, J. S. L. T.; Clément, M. C.; Bass, D. C. (2003) Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. Honey floral species characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 51. p. 3234-3242.

Durham, M. and Regnier, F.E. (2006) Targeted glycoproteomics: Serial lectin affinity chromatography in the selection of O-glycosylation sites on proteins from

the human blood proteome. Journal of Chromatography A. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.070.

Giorgini, J. F. and Gusman, A. B. (1972) A importância das abelhas na polinização. In: Camargo, J. M. F. Manual de Apicultura. Ed. Agronômica Ceres, Brasil. p. 155-163.

Giray, T. and Robinson, G. E. (1996) Common endocrine and genetic mechanisms of behavioral development in male and worker honey bees and the evolution of division of labor. Proc. Natl Acad. Sci. USA. v. 93. p. 11718-11722.

Hartfelder, K. (2000) Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. Brazilian Journal of Medical Biology Research. v. 33. p. 157-17.

Hitchen, P.G. and Dell, A. (2006) Bacterial Glycoproteomics. Microbiology. v. 152. p. 1575-1580.

Jensen, O.N. (2006) Interpreting the protein language using proteomics. Nature Reviews: Molecular Cell Biology. v. 7. p. 391-403.

Kamakura, M.; Fukuda, T.; Fukushima, M.; Yonekura, M. (2001) Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. v. 65. P. 277-284.

Klaudiny, J.; Albert, S.; Bachanova, K.; Kopernicky, J.; Simúth, J. (2005) Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. v. 35. p. 11-22.

Kohno, K.; Okamoto, I.; Sano, O.; Arai, N.; Iwaki, K.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. (2002) Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 1, p. 138-45.

Komatsu, S. S.; Marchini, L. C.; Moreti, A. C. (2002) Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de açúcares e de proteína. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 22. p. 143-146.

Kubo, T.; Sakani, M.; Nakanura, J.; Sasagawa, H.; Ohashi, H.T.; Natori, S. (1996) Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *Journal of Biochemistry*. v. 119. p. 291-295.

Lima, E. D. P. A. (2002) Caracterização física e química dos frutos da umbu-cajazeira (*Spondias spp*) em cinco estádios de maturação, da polpa congelada e néctar. *Revista Brasileira Fruticultura*. v. 24. p. 338-343.

Malekova, B.; Ramser, J.; O'Brien, J. K.; Janitz, M.; Judova, J.; Lehrach, H.; Simúth, J. (2003) Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene*. v. 16. p. 165-175.

Maurizio, A. (1965) Breakdown of sugars by inverting enzymes. *An. Abeille*. v. 5. p. 215-232.

Meri, S. and Baumann, M. (2001) Proteomics: posttranslational modifications, immune responses and current analytical tools. *Biomolecular Engineering*. v. 18. p. 213-220.

Michener, M. H. (1944) Comparative external morphology, phylogeny and a classification of the bees (Hymenoptera). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* v. 82. p. 151-326.

Nagai, T. and Inoue, R. (2004) Preparation and functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*. v. 84. p. 181-186.

Nakajin, S.; Okiyama, L.; Yamasyita, S.; Akiyama, Y.; Shinoda, M. (1982) Effect of royal jelly on experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Yakugaku Zasshi*. v.36. p. 65-69.

Ohashi, K.; Natori, S.; Kubo, T. (1997) Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *European Journal of Biochemistry*. v. 249. p. 797-802.

Okamoto, I.; Taniguchi, Y.; Kunikata, T.; Kohno, K.; Iwaki, K.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. (2003) Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Science*. v. 73. p. 2029-2045.

Piñero-Rodríguez, A. M.; Ayude, D.; Berrocal-Rodríguez, F.J.; de la Cadena, M.P. (2004) Concanavalin A chromatography coupled to two-dimensional gel electrophoresis improves protein expression studies of the serum proteome. *Journal of Chromatography B*. v. 803. p.337-343.

Sano, O.; Kunikata, T.; Kohno, K.; Iwaki, K.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. (2004) Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 52. p. 15-20.

Santos, K.S.; dos Santos, L.D.; Mendes, M.A.; de Souza, B.M.; Malaspina, O.; Palma, M.S. (2005) Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v. 35. p. 85-91.

Scarselli, R.; Donadio, E.; Giuffrida, M.G.; Fortunato, D.; Conti, A.; Balestreri, E.; Felicioli, R.; Pinzauti, M.; Sabatini, A.G.; Felicioli, A. (2005) Towards royal jelly proteome. *Proteomics*. v. 5. p. 769-776.

Schmitzová, J.; Klaudiny, J.; Albert, S.; Schroder, W. I. K.; Shreckengost, W.; Hanes, J.; Júdová, J.; Simúth, J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. Cellular and Molecular Life Science. v. 54. p. 1020-1030.

Shimoda, M.; Nakajin, S.; Oikawa, T.; Sato, K.; Kamogawa, A.; Akivama, Y. (1978) Biochemical studies on vasodilative factor in royal jelly. Yakugaku Zasshi, v.2. p. 139-145.

Simpson, J. Riedel, L. B. M., Wilding, N. (1968) Invertase in the hypopharyngeal glands of the honet bee. Journal of Apiculture Research. v. 7. p. 29-39.

Simúth, J. (2001) Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. Apidologie. v. 32. p. 69-80.

Simúth, J.; Bíliková, K.; Kováčová, E.; Kuzmová, Z.; Schroder, W. (2004) Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- α release is a regular component of honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 52. p. 2154-2158.

Sparbier, K.; Koch, S.; Kessler, I.; Wenzel, T.; Kostrzewa M. (2005) Selective isolation of glycoproteins and glycopeptides for MALDI-TOF MS detection supported by magnetic particles. Journal of Biomolecular Techniques. v. 16. p. 407-143.

Takeshi, N.; Mizuho, S.; Reiji, I.; Hachiro, I.; Nobutaka, S. (2001) Antioxidative activities of some commercially honeys, RJ and propolis. Food and Chemistry. v.75. p. 237-40.

Tamura, T.; Fujii, A.; Kuboyama, N. (1987) Antitumor effects of royal jelly. Folia pharmacologica Japonica. v. 89. p. 73-80.

Tokunaga, K. H.; Yoshida, C.; Suzuki, K. M.; Maruyama, H.; Futamura, Y.; Araki, Y.; Mishima, S. (2004) Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 2. p. 189-92.

Winston, M. L. (1979) Intra-colony demography and reproductive rate of the africanized honeybee in South America. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 4. p. 279-292.

Capítulo único

**Identificação das glicoproteínas da geléia real de
Apis mellifera L. por análise em MALDI-TOF MS**

Resumo

A geléia real (GR), uma secreção produzida pelas glândulas hipofaríngea e mandibular das abelhas operárias, possui uma variedade de atividades farmacológicas, além de ser fundamental para a diferenciação das castas e longevidade da rainha de *Apis mellifera*. Com o objetivo de identificar alguns dos componentes bioativos deste produto da colméia, utilizou-se a cromatografia de afinidade de concanavalina A (ConA) associada à espectrometria de massa para identificar as *N*-glicoproteínas de duas amostras de GR obtidas de origem e condições distintas. As amostras de GR investigadas foram a GR brasileira (GRB), produzida experimentalmente em apiário local, e a GR chinesa (GRC), importada da China e disponível comercialmente. O perfil de proteínas em SDS-PAGE 1D foi característico para GRB e GRC, com um maior número de polipeptídeos para GRC. As frações das *N*-glicoproteínas eluídas da coluna de ConA apresentaram nove polipeptídeos para GRB e 12 para GRC, com massa molecular variando entre 130 e 15 kDa. Observou-se que o congelamento imediatamente pós-coleta da GRB não impediu o aparecimento de polipeptídeos com *M_r* menor que 49 kDa. Um total de 21 bandas foi excisado do gel e digerido por tripsina para análise em MALDI-TOF MS. Para cada perfil de massa dos peptídeos (PMF) obtido, realizou-se a busca em banco de dados utilizando-se o software Mascot. Esta análise revelou que as 16 proteínas identificadas nas amostras de GRB e GRC pertencem à família das apalbuminas (Apa-1, Apa-2 e Apa-3) da abelha *A. mellifera*. A Apa-2 foi a proteína que teve maior prevalência entre as *N*-glicoproteínas da GR, apresentando *M_r* variando entre 110 e 25 kDa. O fato da Apa-2 ter sido identificada com *M_r*s distintas pode estar relacionado a fenômenos de glicosilação, oligomerização ou degradação desta apalbumina. Portanto, a cromatografia de afinidade de ConA associada a análise proteômica possibilitou a identificação de três membros da família das principais proteínas da GR (Apa-1, -2 e -3). Além disso, o estudo comparativo da composição de glicoproteínas da GRB e GRC sugere padrão similar entre estas amostras e pode ser útil em estudos futuros que avaliem as funções biológicas das modificações pós-traducionais das apalbuminas.

Palavras-chave: apalbumina, abelha, proteoma, concanavalina A, geléia real.

Abstract

The royal jelly (RJ), a secretion produced by the hypopharyngeal and mandibular glands of the nurse honeybees, have a variety of pharmacological activities, aside of being necessary for the castes differentiation and the queen *Apis mellifera* longevity. To identify the *N*-glycoproteins of two samples of RJ provenient from distinct origin and conditions, we used the concanavalin A affinity chromatography (ConA) associated to the mass spectrometry. The investigated samples of RJ were the brazilian RJ (GRB), produced experimentally in local apiary, and the Chinese RJ (GRC), mattered from China and commercially available. The protein profile in SDS-PAGE 1D was characteristic for GRB and GRC. The *N*-glycoproteins fractions eluted from the ConA column had presented nine polypeptides for GRB and 12 for GRC, with relative molecular mass (*Mr*) varying between 130 and 15 kDa. It was observed that the immediately after-collects freezing of the GRB did not inhibited the appearance of bands with *Mr* lesser than 49 kDa. A total of 21 bands was excised from gel and digested with trypsin for analysis in MALDI-TOF MS. The bioinformatic analysis revealed that all the 16 proteins identified in the GRB and GRC samples belong to the *A. mellifera* apalbumins family (Apa-1, Apa-2 and Apa-3). The Apa-2 was the protein that had greater prevalence between the *N*-glycoproteins of the RJ, presenting *Mr* varying between 110 and 25 kDa. The fact that the Apa-2 had been identified with distinct *Mrs* can be related to glycosilation, oligomerization or degradation of this apalbumin. Therefore, the ConA affinity chromatography associated with the proteomic analysis made possible the identification of three members of the family of RJ main proteins (Apa-1, Apa-2 and Apa-3). Moreover, the comparative study of the GRB and GRC glycoprotein composition suggests similar standard between these samples and can be useful in future studies that evaluate the biological functions of the apalbumins pos-translational modifications.

Keywords: MRJP, apalbumin, honeybee, proteom, concanavalin A, royal jelly.

Introdução

A apicultura brasileira é, atualmente, uma das mais importantes do mundo em termos quantitativos e qualitativos, no que se refere à produção de mel; enquanto que informações a respeito da produção de outros produtos apícolas são quase totalmente inexistentes. Entretanto, algumas atividades especializadas da apicultura, como a produção de geléia real, têm alcançado interesse comercial no Brasil, uma vez que esta se apresenta como uma fonte de renda alternativa para os apicultores (Queiroz et al., 2001). Portanto, estudos que agreguem valor a este produto da colméia podem influenciar a atividade dos apicultores brasileiros e incentivar a produção de geléia real.

A geléia real (GR), secretada pelas glândulas hipofaríngea e mandibular das abelhas operárias *Apis mellifera* entre a sexta e a 12ª semana de vida, é o alimento da rainha durante toda a sua vida e das operárias nos primeiros três dias de vida (Schmitzová et al., 1998). A dieta larval possui uma importante função no polifenismo da abelha *A. mellifera*, determinando uma série de eventos moleculares responsáveis pela diferenciação celular das larvas (Scarselli et al., 2005).

Esse produto da colméia vem sendo difundido e utilizado como um alimento funcional devido a sua ampla variedade de atividades farmacológicas. Dentre essas podemos destacar a atividade vasodilatadora e hipotensora (Tokunaga et al., 2004), anti-hipercolesterolêmica (Shen et al., 1995), anti-oxidante (Nagai and Inoue, 2004), anti-inflamatória (Kohno et al., 2004), anti-fadiga (Kamakura et al., 2001b), anti-bacterial (Fujiwara et al., 1990), cicatrizante (Fuji et al., 1990) e imunomodulatória (Okamoto et al., 2003), entre outras.

A GR possui de 9 a 15% do seu peso total em proteínas e, nos últimos anos, vários estudos têm identificado e caracterizado essas proteínas. Dentre elas destacam-se a royalisina e as jaleínas, que são peptídeos antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Fontana et al., 2004); e a apisina, uma glicoproteína de 350 kDa que estimula a proliferação de monócitos humanos (Yonekura, 1998). Entretanto, os componentes protéicos mais importantes da GR são aqueles pertencentes à família das principais proteínas da GR, MRJPs, denominadas de apalbuminas por Simúth (2001) por apresentarem

propriedades semelhantes às albuminas. Dentre elas, cinco proteínas (apalbumina-1 a -5) com massa molecular relativa de 49 a 87 kDa já foram identificadas (Scarselli et al., 2005).

A apalbumina-1 (Apa-1, 55 kDa) é a glicoproteína dominante da GR, representando 48% do total de proteínas solúveis, possui função nutricional, participa do processamento dos produtos da abelha (mel e pólen) e está expressa nos corpos do cogumelo do cérebro da abelha e na glândula hipofaríngeal de operárias nutridora e campeira (Simúth et al., 2004; Kucharski et al., 1998). A apalbumina-3 (Apa-3) existe em cinco isoformas e juntamente com as apalbuminas-2 e -5 (Apa-2, Apa-5) são consideradas as reservas biológicas de nitrogênio para o rápido desenvolvimento das abelhas (Majtán et al., 2006).

Recentemente, Scarselli et al. (2005) verificaram vinte *spots* da GR de *A. mellifera ligustica* em gel 2D, e a partir da identificação do perfil de massas dos peptídeos obtidos por MALDI-TOF e análise em banco de dados, identificaram seis proteínas diferentes. Além disso, Santos et al. (2005) identificaram 34 proteínas na secreção da glândula hipofaríngeal de nutridora *A. mellifera*, sendo que 27 pertencem à família das apalbuminas. Várias isoformas das Apa-1, -2, -3 e -5 foram identificadas neste estudo, como também a presença das Apa-6, -7 e -8, que não foram identificadas no proteoma da GR (Sano et al., 2004).

Vários estudos têm caracterizado as proteínas da GR como glicoproteínas. A análise da estrutura total de *N*-glicoproteínas da GR revelou a ocorrência de 71.6% da estrutura do tipo alta-manose, 8.4% da estrutura do tipo biantenária e 3% da estrutura tipo híbrida (Kimura et al., 2000). Neste contexto, Yonekura (1998) identificou a estrutura de *N*-glicanas ligadas a apisina (Man9-5GlcNAc2) e a Apa-1 (Man9GlcNAc2), caracterizando-as como estruturas do tipo alta-manose. Mais recentemente, uma análise da estrutura de *N*-glicanas dos componentes em menor quantidade da GR, demonstrou que três *N*-glicanas têm o resíduo de β -galactose em uma estrutura do tipo complexa (Kimura et al., 2003).

Dentre os mais de 100 tipos de modificações pós-traducionais (PTMs), a glicosilação é a mais comum (Durham and Regnier, 2006). As PTMs definem a função e a plasticidade estrutural das proteínas, regulando não somente as funções individuais como também a estabilidade de todo o complexo protéico, influenciando as interações macromoleculares fundamentais para um amplo

número de processos moleculares (Meri and Baumann, 2001; Jensen, 2006). Por isso, o desenvolvimento de métodos de análise proteômica para o estudo das PTMs, como a glicosilação, estão se tornando tão importantes (Bauer and Kuster, 2003).

Portanto, visto que a análise sistemática da *N*-glicosilação das proteínas da GR é ainda fragmentada e que o enriquecimento e a purificação são as prioridades para análise em MALDI-TOF MS, este estudo utiliza a cromatografia de afinidade de concanavalina A, a eletroforese SDS-PAGE 1D e a espectrometria de massa MALDI-TOF como ferramentas para a identificação das glicoproteínas da GR brasileira e chinesa, provenientes de diferentes condições de coleta e armazenamento.

Materiais e Métodos

Material Biológico

A GR brasileira (GRB) foi produzida experimentalmente em um apiário local (Apiário Girassol Ltda e Uberlândia-MG, Brasil), proveniente da produção de abelhas *A. mellifera* africanizadas. As amostras de GRB foram coletadas diretamente em microtubos, que foram imediatamente imersos em N₂ líquido, transportados para o laboratório e armazenados em ultrafreezer a -80°C. A GR chinesa (GRC), fornecida pelo mesmo apiário, trata-se de uma GR produzida por abelhas *A. mellifera* européias, disponível comercialmente e fornecida por distribuidores que importam este produto da China. Deste modo, a coleta, armazenamento e o transporte destas amostras seguiram o regulamento técnico para controle de qualidade da geléia real (Instrução normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001). Amostras de 2g de GRB e GRC foram homogeneizadas em 10 mL de tampão 50mM Tris-HCl pH 8.0, contendo como inibidores de proteases a benzamidina, aprotinina e o PMSF. O homogeneizado foi centrifugado a 50.000 xg por uma hora a 4°C. A partir da fração sobrenadante (S₁), retiraram-se alíquotas para análise em SDS-PAGE e dosagem de proteína total. O restante da fração S₁ foi preparado para a cromatografia de afinidade em resina de concanavalina A-sepharose-4B (ConA).

Cromatografia de afinidade

A resina de ConA (Amersham Pharmacia Biotech) foi equilibrada em 30 volumes de tampão de equilíbrio (20mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5M NaCl) e 30 volumes do mesmo tampão contendo 1mM CaCl₂. Para a obtenção do perfil cromatográfico, a fração S₁ de GR contendo 2mM de CaCl₂ foi incubada com 2mL da resina de ConA, em gelo, por duas horas. Em seguida, centrifugou-se o mix da resina e fração S₁ de GR a 2.000 rpm por 5 minutos a 4°C para obtenção do volume excluído da coluna (*void*). Coletou-se o *void* e lavou-se a resina com 30 volumes do tampão de equilíbrio, separando o lavado da resina a partir de nova centrifugação. Nesta etapa, obteve-se a fração não ligada a ConA (lavado) que

contém as proteínas da GR não-glicosiladas e O-glicosiladas, além do excesso de N-glicoproteínas. Para a eluição das frações constituídas de N-glicoproteínas, a resina foi montada em coluna de vidro (10 x 0.8 cm) e eluída com 0.1M α -D-manopiranosídeo (Amersham Pharmacia Biotech) em tampão de equilíbrio. Em seguida, procederam-se a limpeza e recuperação da resina para nova cromatografia de acordo com o protocolo do fabricante.

Deteção e Dosagem de proteína

A detecção dos picos protéicos foi realizada em microplaca de 96 *wells*, utilizando-se 15 μ L da amostra e 45 μ L do reagente de Bradford. As amostras detectadas como positivas foram destinadas a dosagem de proteína total pelo método de Bradford (1976), realizada em espectrofotômetro com leitura a 595nm. Posteriormente, as amostras foram preparadas para análise em eletroforese unidimensional em condições desnaturantes (SDS-PAGE 1D), em gel gradiente de 5-22% (Laemmli and Favre, 1973). A separação eletroforética dos polipeptídeos foi realizada a corrente constante de 30 mA. O gel gradiente foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorado com solução descorante, contendo metanol e ácido acético, para visualização dos polipeptídeos.

Peptide mass fingerprint (PMF)

As bandas correspondentes às proteínas eluídas foram excisadas do gel, descoradas com metanol, seguindo-se de redução e alquilação com DTT e iodoacetamida. Posteriormente, as proteínas foram digeridas com tripsina 12.5 ng/ μ L (Promega, Madison, WI, USA) em solução de 50mM NH_4HCO_3 e 5mM CaCl_2 a 37°C por 12 horas. Os peptídios foram submetidos à microcromatografia em ZipTip C18 (Milipore, Billerica, MA, USA) e extraídos com solução de acetonitrila e ácido trifluoracético (66:0.1, v/v). Em seguida, realizou-se a espectrometria de massa em equipamento Bruker Daltonics Reflex IV por tempo de voo com desorção à laser e ionização assistida por matriz (MALDI-TOF MS).

Picos conhecidos de produtos de autólise de tripsina e de contaminantes de queratina foram removidos do espectro.

Identificação de proteínas

As proteínas foram identificadas por *peptide mass fingerprint* (PMF). A busca no banco de dados NCBI nr para a identificação das proteínas foi realizada pelo Mascot (Matrix Science Ltd. London, UK), admitindo-se score > 60 (correspondente ao *p value* < 0.05). Vale ressaltar que não se restringiu a massa molecular das proteínas ou a linhagem filogenética, e a tolerância de variação da massa foi admitida no intervalo de 0.5-0.2 Da para dados monoisotópicos $[M+H]^+$. Os possíveis sítios de glicosilação das proteínas foram preditos pelo Swiss-Prot, a partir da estrutura das proteínas encontrada em banco de dados (<http://expasy.ch/tools>).

Resultados e Discussão

As N-glicoproteínas da geléia real brasileira (GRB) e chinesa (GRC) foram isoladas por cromatografia de afinidade de ConA e identificadas por análise em MALDI-TOF MS. Primeiramente, a análise em SDS-PAGE 1D revelou um perfil protéico característico para GRB e GRC, e as frações eluídas da coluna de ConA também apresentaram um perfil de N-glicoproteínas distinto para cada amostra (Fig. 01).

Comparando o perfil eletroforético da GRB e GRC, observaram-se bandas diferenciais com massas moleculares relativas (Mr) variadas, sendo que as diferenças mais evidentes foram para os polipeptídeos de aproximadamente 130, 75, 50, 35 e 15 kDa (Fig. 01A). Estes dados concordam com Sano et al. (2004) que verificaram, em SDS-PAGE 2D, diferenças substanciais entre a GR de abelhas africanizadas e européias. A GR é composta por 9 a 15% de proteínas. Dentre estas, as solúveis em água (WSPs) representam 46 a 89% do total, sendo 80% destas proteínas pertencentes à família das principais proteínas da GR, as apalbuminas (Schmitzová et al., 1998). As apalbuminas foram caracterizadas, por clonagem de cDNA e seqüenciamento, em cinco principais proteínas, referidas como apalbumina-1 a -5, segundo estudo de Okamoto et al. (2003). Entretanto, a composição da GR pode variar de acordo com o estado fisiológico e metabólico da abelha nutridora, a idade da larva, a espécie da abelha, as condições sazonais e regionais (Albert et al., 1999; Scarselli et al., 2005).

As bandas polipeptídicas observadas em SDS-PAGE para GRB e GRC corresponderam a proteínas com Mr diferentes daquelas já relatadas para as proteínas da GR. Para a família das apalbuminas já foram identificadas proteínas com Mr variando entre 49 e 87 kDa (Schmitzová et al., 1998), além de formas oligoméricas de alta Mr como 420 kDa para Apa-1 (Majtán et al., 2006), 210 kDa para Apa-3 (Okamoto et al., 2003) e 350 kDa para apisina (Kimura et al., 2000). Além disso, Hitchen and Dell (2006) postularam que o fato de algumas proteínas apresentarem em SDS-PAGE uma migração diferenciada, confirma a ocorrência de PTMs na proteína.

A ConA é uma lectina que interage com resíduos de açúcares da cadeia de oligossacarídeos do tipo alta-manose de outras proteínas, obtendo uma fração enriquecida em *N*-glicoproteínas (Sparbier et al., 2005). Essa lectina reconhece resíduos de glicose (Glc α), manose (Man α 1) e N-acetilglicosamina (GlcNAc α 1) na região não-reduzida da cadeia de açúcar, assim como resíduos de 2Glc α 1 e 2Man α 1 localizados na posição interna da cadeia de carboidratos (Piñero-Rodriguez et al., 2004). A cromatografia de afinidade de ConA acoplada a eletroforese bidimensional vem sendo utilizada para o estudo das proteínas, como uma forma de identificação de proteínas diferentemente expressas (Piñero-Rodriguez et al., 2004).

Analizando as frações de *N*-glicoproteínas da GRB e GRC eluídas da resina de ConA observaram-se a presença de nove polipeptídeos para GRB e 12 para GRC, sendo alguns desses a princípio semelhantes e outros diferenciais com *Mr* variando entre aproximadamente 130 a 15 kDa (Fig. 01B). Um total de 21 bandas foram excisadas do gel, digeridas com tripsina e a massa dos peptídeos identificada por MALDI-TOF MS. A análise do PMF em banco de dados Mascot demonstrou que 16 proteínas foram identificadas, sendo que todas pertencem à família das apalbuminas de *A. mellifera*. Pesquisas no Swiss-Prot revelaram o possível padrão de glicosilação destas proteínas. Cinco bandas não obtiveram um PMF válido e, portanto não puderam ser identificadas (Tabela 01).

Alguns polipeptídeos, a princípio análogos, pois obtiveram migração relativa no gel semelhante, foram identificados como a mesma proteína para ambas as amostras de GR. Tal fato pode ser observado para os polipeptídeos B5 e C9 que foram identificados como apa-2 de *A. mellifera*. Por outro lado, os polipeptídeos diferenciais B2 para GRB e C2, C3, C4 e C8 para GRC também foram identificados como Apa-2. A Apa-2 foi a proteína que teve maior prevalência entre as *N*-glicoproteínas da GR, apresentando *Mrs* variando entre 110 e 25 kDa. A Apa-2 é descrita como uma proteína de 49 kDa e portanto, algumas alterações na migração no gel podem ser devido a glicosilação, oligomerização ou degradação.

A *N*-glicosilação pode aumentar a *Mr* da proteína para mais de 800 Da dependendo do tipo e da quantidade de cadeias de açúcares ligadas a proteína (Jensen, 2006), o que justifica a identificação da Apa-2 com *Mr* de

aproximadamente 65 kDa. Boivin et al. (2001) a partir de análise em SDS-PAGE da ceruloplasmina nativa humana observaram duas bandas com Mr de 129 e 116 kDa e, a partir de análise em espectrometria de massa, verificaram que essas correspondiam a uma variação nos níveis de glicosilação desta proteína.

Para as Apa-2 identificadas com Mr de 100 e 110 kDa sugere-se a formação de dímeros glicosilados. A oligomerização resistente à temperatura, SDS e outros reagentes redutores já foi descrita para algumas proteínas. A proteína Z19, por exemplo, pode ser visualizada em SDS-PAGE 1D na sua forma oligomérica mesmo quando tratada com agentes redutores e alta temperatura (Cabra et al., 2006). Além disso, Okamoto et al. (2003) descreveram a tendência a oligomerização da Apa-3, o que pode também ter ocorrido com a Apa-2.

Os polipeptídeos com Mr inferior a 49 kDa podem ser produtos de degradação das apalbuminas. Embora, Schmitzová et al. (1998) não observaram, por análise em SDS-PAGE 1D da GR, polipeptídeos com Mr menor que 49 kDa, outros estudos relataram polipeptídeos com Mr menor que 45 kDa (Kamakura et al., 2001a; Nagai and Inoue, 2004). Além disso, amostras de GR armazenadas por sete dias a 4°C ou 40°C sofrem degradação protéica e apresentam polipeptídeos com Mr variando entre 65 e 25 kDa (Kamakura et al., 2001a; 2001b). Em análise 2D da GR de *A. mellifera*, Scarselli et al. (2005) visualizaram produtos de degradação das Apa- 1 e -3 com Mr menor que 30 kDa. Por outro lado, Sano et al. (2004) não visualizaram polipeptídeos menores que 45 kDa em eletroforese 2D realizada em gel com 10% de poliacrilamida.

Analisando o perfil protéico da GRB e GRC observou-se que o congelamento imediatamente pós-coleta da GRB não impediu o aparecimento de polipeptídeos com Mr menor que 49kDa, sugerindo que a degradação das proteínas da GR provavelmente é um processo inerente à produção deste produto da colméia, ocorrendo quando a GR é secretada pelas glândulas das abelhas operárias nutridoras e depositada nas realeiras. Uma vez que a GR é normalmente coletada num prazo de 44 a 72 horas após a transferência da larva, as proteínas estariam sujeitas a algum tipo de degradação proteolítica (Queiroz et al., 2001). Além disso, comparando o perfil protéico da secreção da glândula hipofaríngea de abelhas operárias nutridoras de sete dias e da GR observou-se que as apalbuminas são produzidas pela glândula e secretadas como

componentes da GR onde sofrem proteólise e outras modificações, gerando novas isoformas observadas somente nas amostras de GR (Sano et al., 2004).

A Apa-2 foi identificada na maioria dos polipeptídeos resolvidos na eletroforese unidimensional, apesar da Apa-1 ser caracterizada como a glicoproteína mais abundante da GR. Entretanto, as Apa-1 e -2 apresentam 62.64% de identidade e a menor diferença entre os aminoácidos (15.82%) (Albert and Klaudiny, 2004). Além disso, a Apa-1 apresentou-se mais abundante na fração que não se ligou a coluna (Fig. 02). Tal fato poderia ser justificado pelo grau de glicosilação da Apa-2, uma vez que mudanças no estado de glicosilação podem levar a alterações no perfil de glicoproteínas ligadas à ConA (Wang et al., 2006; Scarselli et al., 2005) e, de acordo com Santos et al. (2005), a Apa-2 possui várias isoformas apresentando diferentes graus de glicosilação.

Os polipeptídeos C6 e C7 foram identificados na GRC como Apa-1 e Apa-2, respectivamente. Estes polipeptídeos correspondem ao B4 em GRB identificado como um mix da Apa-1 e Apa-2. De acordo com a seqüência da Apa-2 e análise no Swiss-Prot, esta proteína possui dois possíveis sítios de glicosilação situados nos aminoácidos 145 e 178 (N-Asn-Arg-Thr e N-Asn-Ala-Thr), enquanto que a Apa-1 possui três possíveis sítios localizados nos aminoácidos 28, 144 e 177 (N-Asn-Lys-Ser; N-Asn-Asn-Thr e N-Asn-Ala-Thr). As possíveis estruturas de *N*-glicanas da Apa-1 foram identificadas por Kimura et al. (1996) como sendo $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}6$; $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}\alpha 1\text{-}3$; $\text{Man}\alpha 1\text{-}6$ e $\text{Man}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$, caracterizando uma estrutura do tipo alta-manose. Para a Apa-2 não foram encontrados dados na literatura sobre as possíveis estruturas de *N*-glicanas, embora a análise da estrutura total de *N*-glicoproteínas da GR, realizada por Kimura et al. (2000), revelou a ocorrência de 71.6% da estrutura do tipo alta-manose, o que justifica a ligação das apalbuminas à resina de ConA e confirma os dados apresentados neste trabalho.

Além disso, um precursor da Apa-1 que contém os domínios para jaleínas I, II e IV (MRJP1_APIME) foi identificado somente na GRB (B9). Este dado concorda com Scarselli et al. (2005) que também identificaram oito *spots* deste precursor para Apa-1 em gel 2D, correspondente a fragmentos da região C-terminal desta proteína (Fontana et al., 2004). A presença de fragmentos da Apa-1 na GR pode ser confirmada pelos dados de Simúth et al. (2004) que

imunodetectaram peptídeos com Mr menor que 55 kDa, utilizando o anticorpo anti-Apa-1; assim como por outros autores que detectaram a presença de proteinases na GR (Chen and Chen, 1995) e caracterizaram a degradação da Apa-1 como sendo dependente do tempo e da temperatura de estocagem (Kamakura et al., 2001a; 2001b; Kamakura and Fukushima, 2002).

A Apa-3 (RJP57-1) foi identificada tanto na GRB (B1 – 130 kDa e B3 – 60 kDa) como na GRC (C1 – 130 kDa), sendo que os polipeptídeos B1 e C1 são correspondentes. De acordo com a sequência da Apa-3 e análise no Swiss-Prot, esta proteína possui somente um possível sítio de glicosilação situado no aminoácido 183 (N-Asn-Ala-Thr). Schmitzová et al. (1998) identificaram quatro proteínas com Mr entre 60 e 70 kDa caracterizadas como variantes da Apa-3, produto de um gene altamente polimórfico e Okamoto et al. (2003) a partir do tratamento desta proteína purificada com uma *N*-glicosidase F, caracterizou-a como uma glicoproteína, sugerindo que esta possui uma estrutura do tipo alta-manose e uma tendência para a oligomerização, formando um trímero de 210 kDa. Sendo assim, é possível que o polipeptídeo de aproximadamente 130 kDa seja um dímero da glicoproteína Apa-3.

As Apa-4 e -5 não foram identificadas como glicoproteínas da GR mesmo possuindo sítios de glicosilação. De acordo com a análise no Swiss-Prot, a Apa-4 possui oito possíveis sítios de glicosilação, entretanto essa proteína é descrita por Schmitzová et al. (1998) como uma proteína presente na GR em quantidades bem reduzidas, o que dificulta a identificação desta em SDS-PAGE frente a grande quantidade de outras apalbuminas. Deste modo, assim como a Apa-4, outras prováveis *N*-glicoproteínas da GR presentes em menor quantidade não foram identificadas devido a presença abundante de Apa-2, que pode ter saturado a resina impedindo a ligação de outras *N*-glicoproteínas.

Além disso, a análise em SDS-PAGE da GR demonstrou que existe uma diferença individual da solubilidade das apalbuminas. A Apa-5 é descrita como a menos solúvel em tampão fosfato, assim como a Apa-1 em água, enquanto que a Apa-2 possui a maior solubilidade em ambos solventes (Schmitzová et al., 1998). Por isso, a Apa-5, apesar de possuir quatro sítios de glicosilação, pode não ter se ligado à resina, uma vez que o tampão utilizado provavelmente não possibilitou a solubilização desta proteína.

A cromatografia de afinidade de ConA associada a análise proteômica possibilitou a identificação das três principais glicoproteínas da GR (Apa-1, Apa-2 e Apa-3). Esta abordagem de isolar as *N*-glicoproteínas da GR por coluna de ConA, além de ser uma técnica simples e reprodutível, possibilita a separação de proteínas com diferentes perfis de glicosilação, tornando-se uma ferramenta potencial para estudos comparativos. Novos estudos poderão ser realizados para identificar e caracterizar as *N*-glicoproteínas da GR presentes em menor quantidade, a partir das abordagens utilizadas neste estudo além de outras metodologias de extração protéica, determinação das estruturas das *N*-glicanas e localização dos sítios reais de glicosilação.

A glicosilação afeta a atividade biológica da proteína podendo inclusive aumentar a variedade das interações protéicas (Meri and Baumann et al., 2001); desta forma, os componentes de carboidratos das apalbuminas podem conferir a esta família de proteínas funções biológicas ainda não determinadas. Devido a isso, este estudo comparativo da composição de glicoproteínas da GRB e GRC contribuiu para confirmar a abundância de algumas apalbuminas na GR e ainda revelar diferentes isoformas destas proteínas, geradas por modificações distintas como o padrão de glicosilação, processos de oligomerização ou degradação proteolítica. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para revelar as possíveis funções associadas às modificações pós-traducionais das apalbuminas, enquanto constituintes protéicos principais da geléia real da abelha *A. mellifera*.

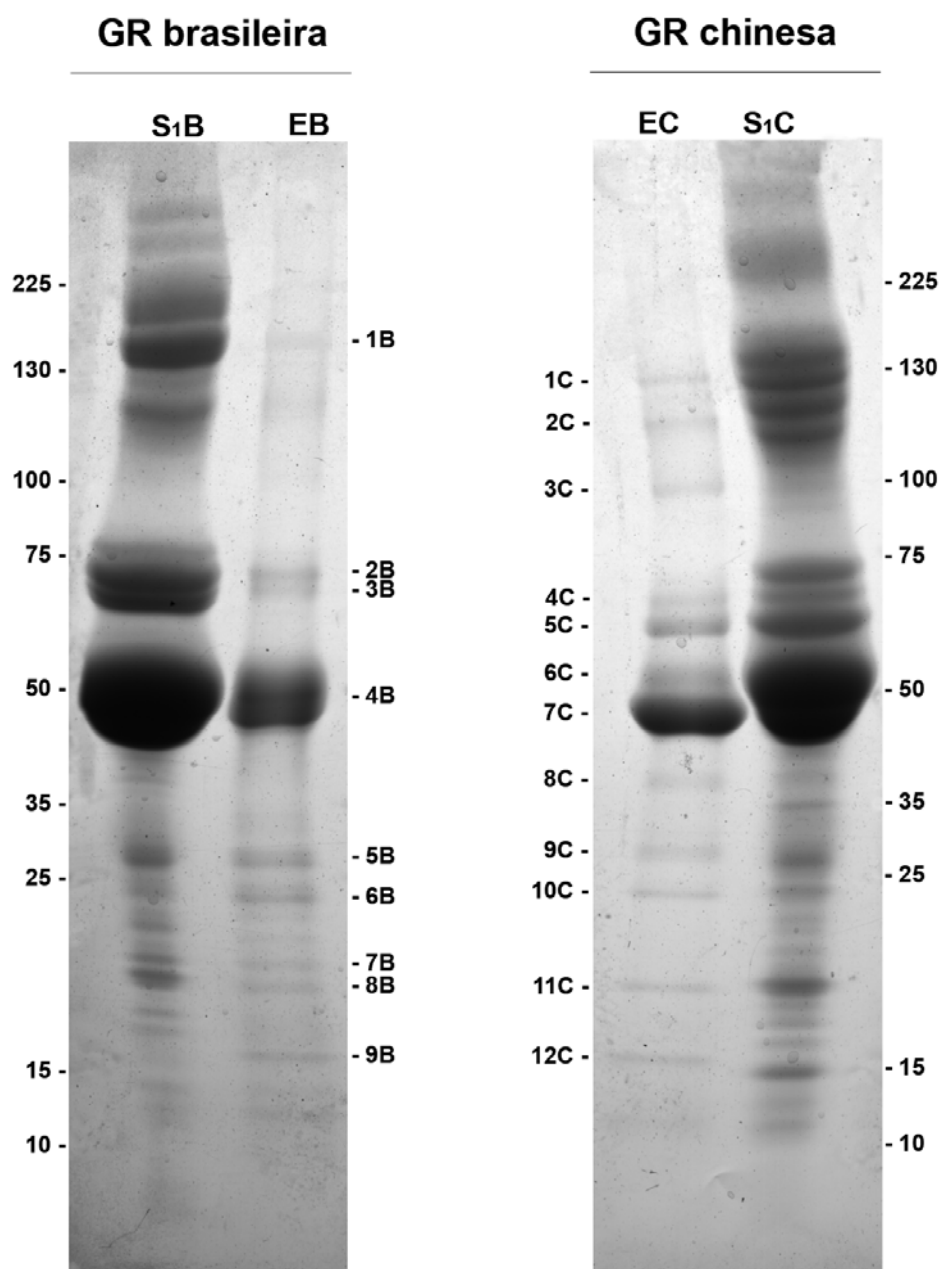
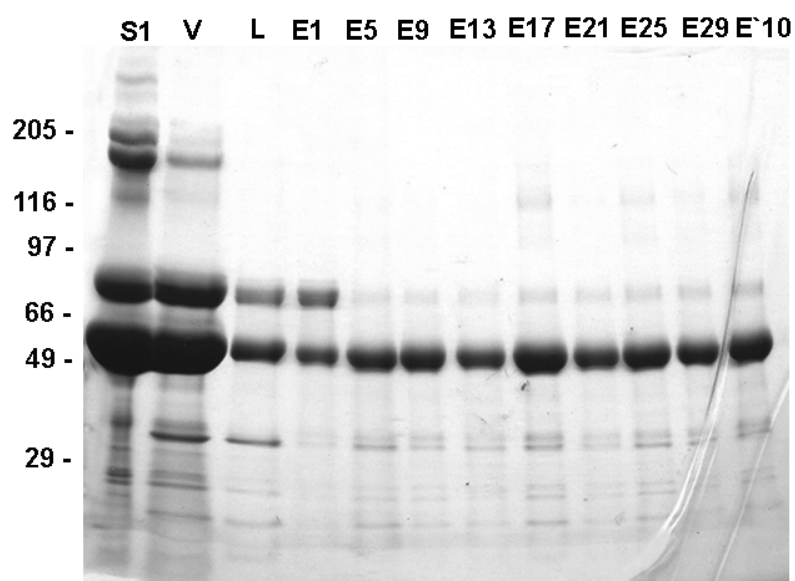


Figura 01: Perfil eletroforético das frações sobrenadante e eluído das amostras de geléia real brasileira (GRB – Fig.01A) e geléia real chinesa (GRC – Fig.01B). Os números das bordas representam o padrão de massa molecular conhecida e os do centro, as bandas que foram excisadas do gel para análise em MALDI-TOF MS.

Geléia real brasileira



Geléia real chinesa

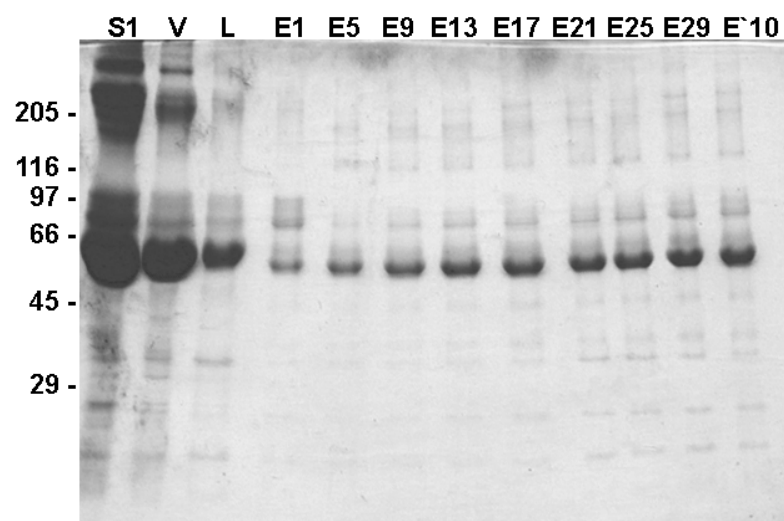


Figura 02: Perfil cromatográfico das glicoproteínas da geléia real brasileira (GRB) e geléia real chinesa (GRC) eluídas da coluna de concanavalina A. Os números das bordas representam o padrão de massa molecular conhecida. S1: fração sobrenadante, V: *void* (volume excluído da coluna), L: lavado da coluna, E1 – E'10: eluídos da coluna.

Tabela 01. Identificação das glicoproteínas da geléia real brasileira (B1 – B9) e geléia real chinesa (C1 – C12) da abelha *Apis mellifera* L.

ID	Massa Exp. (kDa)	% de cobertura	Score	Massa Teórica (kDa)	Nome
B1	225 - 130	17%	107	61966	major royal jelly protein 3 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585142)
B2	75 - 50	17%	104	51041	major royal jelly protein 2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585108)
B3	75 - 50	17%	84	53155	royal jelly protein RJP57-1 – honeybee [<i>Apis mellifera</i>] (gi 1079192)
B4	50	18% 15%	185	-	Mixture 1 - Components (only one family member shown for each component): major royal jelly protein 2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585108 – Score: 101) and major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585098 – Score: 69)
B5	35 - 25	17%	106	51441	major royal jelly protein 2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585108)
B6	25 - 15	-	-	-	Not identified
B7	25 - 15	16%	79	51441	major royal jelly protein 2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585108)
B8	25 - 15	-	-	-	Not identified
B9	25 - 15	14%	69	49311	(MRJP1_APIME) Major royal jelly protein 1 precursor (MRJP-1) (Bee-milk protein) [Contains: Jellein-1 (Jelleine-I); Jellein-2 (Jelleine-II); Jellein-4 (Jelleine-IV) (O18330)
C1	130	19%	96	53155	royal jelly protein RJP57-1 – honeybee [<i>Apis mellifera</i>] (gi 1079192)
C2	130 - 100	24%	112	51441	major royal jelly protein 2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585108)
C3	100	19%	84	51441	major royal jelly protein 2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585108)
C4	75 - 50	18%	107	51441	major royal jelly protein 2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585108)
C5	75 - 50	20%	110	61996	major royal jelly protein 3 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585142)
C6	> 50	23%	97	49311	major royal jelly protein 1 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585098)
C7	< 50	26%	120	51441	major royal jelly protein 2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585108)
C8	50 - 35	29%	90	51441	major royal jelly protein 2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 58585108)
C9	35 - 25	25%	96	51441	major royal jelly protein MRJP2 [<i>Apis mellifera</i>] (gi 3676300)
C10	25 - 15	-	-	-	Not identified
C11	25 - 15	-	-	-	Not identified
C12	25 - 15	-	-	-	Not identified

Referências Bibliográficas

Albert, S.; Klaudiny, J.; Simúth, J. (1999) Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. Insect Biochemistry and Molecular Biology. v. 29. p. 427-434.

Albert, S. and Klaudiny, J. (2004) The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. Journal of Insect Physiology. v. 50. p. 51-59.

Bauer A. and Kuster, B. (2003) Affinity purification-mass spectrometry: Powerful tools for the characterization of protein complexes. European Journal of Biochemistry. v. 270. p. 570-578.

Boivin, S.; Aouffen, M.; Fournier, A.; Mateescu, M. (2001) Molecular characterization of human and bovine ceruloplasmin using MALDI-TOF mass spectrometry. Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 288. p. 1006-1010.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. v. 7. p. 248-254.

Cabra, V.; Arreguin, R.; Duhalt-Vazquez, R.; Farres, A. (2006) Effect of temperature and pH on the secondary structure and processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein. Biochimica et Biophysica Acta. v. 1764. p. 1110-1118.

Chen, C. and Chen, S.Y. (1995) Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. Food Chemistry. v. 54. p. 195-200.

Durham, M. and Regnier, F.E. (2006) Targeted glycoproteomics: Serial lectin affinity chromatography in the selection of O-glycosylation sites on proteins from

the human blood proteome. Journal of Chromatography A. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.070.

Fontana, R.; Mendes, M.A.; Monson de Souza, B.; Konno, K.; César, L.M.M.; Malaspina, O.; et al. (2004) Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). Peptides. v. 25. p. 919-928.

Fuji, A.; Kobayashi, S.; Kuboyama, N.; Furukawa, Y.; Kaneko, Y.; Ishihama, S.; Yamamoto, H.; Tamura, T. (1990) Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. Japan Journal of Pharmacology. v. 53. p. 331-337.

Fujiwara, S.; Imai, J.; Fujiwara, M.; Yaeshima, T.; Kawashima, T.; Kobayashi, K. (1990) A potent antimicrobial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. The Journal of Biological Chemistry. v. 265. P. 11333-11337.

Hitchen, P.G. and Dell, A. (2006) Bacterial Glycoproteomics. Microbiology. v. 152. p. 1575-1580.

Jensen, O.N. (2006) Interpreting the protein language using proteomics. Nature Reviews: Molecular Cell Biology. v. 7. p. 391-403.

Kamakura, M.; Fukuda, T.; Fukushima, M.; Yonekura, M. (2001a) Storage-dependent degradation of 57 kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. v. 65. p. 277-284.

Kamakura, M.; Mitani, N.; Fukuda, T.; Fukushima, M. (2001b) Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. v. 47. p. 394-401.

Kamakura, M. and Fukushima, M. (2002) Inhibition of specific degradation of 57 kDa protein in royal jelly during storage by ethylenediaminetetaracetic acid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v. 66. p. 175-178.

Kimura, Y.; Kajiyama, S.; Kanaeda, J.; Izukawa, T.; Yonekura, M. (1996) *N*-linked sugar chains of 55 kDa royal jelly glycoprotein. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v. 60. p. 2099-2102.

Kimura, Y.; Miyagi, C.; Kimura, M.; Nitoda, T.; Kawai, N.; Sugimoto, H. (2000) Structural features of *N*-glycans linked to royal jelly glycoproteins: structures of high-mannose type, hybrid type, and biantennary type glycans. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v. 64. p. 2109-2120.

Kimura, Y.; Tsumura, K.; Kimura, M.; Okihara, K.; Sugimoto, H.; Yamada, H. (2003) First evidence for occurrence of Gal β 1-3GlcNAc β 1-4Man unit in *N*-glycans of insect glycoprotein: β 1-3Gal and β 1-4GlcNAc transferases are involved in *N*-glycan processing of royal jelly glycoproteins. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v. 67. p. 1852-1856.

Kohno, K.; Okamoto, I.; Sano, O.; Arai, N.; Iwaki, K.; Ikeda, K.; Kurimoto, M. (2004) Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v. 68. p. 138-145.

Kucharski, R.; Maleszka, R.; Hayward, D.C.; Ball, E.E. (1998) A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. *Naturwiss*. v. 85. p. 343-346.

Laemmli, U.K. and Favre, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. *Journal of Molecular Biology*. v. 80. p. 575-599.

Majtán, J.; Kováčová, E.; Bíliková, K.; Simúth, J. (2006) The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein- on TNF α release. *International Immunopharmacology*. v. 6. p. 269-278.

Meri, S. and Baumann, M. (2001) Proteomics: posttranslational modifications, immune responses and current analytical tools. *Biomolecular Engineering*. v. 18. p. 213-220.

Nagai, T. and Inoue, R. (2004) Preparation and functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*. v. 84. p. 181-186.

Okamoto, I.; Taniguchi, Y.; Kunikata, T.; Kohno, K.; Iwaki, k.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. (2003) Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Science*. v. 73. p. 2029-2045.

Piñero-Rodríguez, A. M.; Ayude, D.; Berrocal-Rodríguez, F.J.; de la Cadena, M.P. (2004) Concanavalin A chromatography coupled to two-dimensional gel electrophoresis improves protein expression studies of the serum proteome. *Journal of Chromatography B*. v. 803. p.337-343.

Queiroz, M.L.; Barbosa, S.B.P.; Azevedo, M. (2001) Produção de geléia real e desenvolvimento da larva de abelha *Apis mellifera*, na região semi-árida de Pernambuco. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 30. p. 449-453.

Sano, O.; Kunikata, T.; Kohno, K.; Iwaki, K.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. (2004) Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 52. p. 15-20.

Santos, K.S.; dos Santos, L.D.; Mendes, M.A.; de Souza, B.M.; Malaspina, O.; Palma, M.S. (2005) Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v. 35. p. 85-91.

Scarselli, R.; Donadio, E.; Giuffrida, M.G.; Fortunato, D.; Conti, A.; Balestreri, E.; Felicioli, R.; Pinzauti, M.; Sabatini, A.G.; Felicioli, A. (2005) Towards royal jelly proteome. *Proteomics*. v. 5. p. 769-776.

Schmitzová, J.; Klaudiny, J.; Albert, S.; Hanes, J.; Schroder W.; Schrockengost, V. et al. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell and Molecular Life Sciences*. v. 54. p. 1020-1030.

Shen, X.; Lu, R.; He, G. (1995) Effects of lyophilized royal jelly on experimental hyperlipidemia and thrombosis. *Chinese Journal of Preventive Medicine*. v. 29. p. 27-29.

Simúth, U. (2001) Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*. v. 32. p. 69-80.

Simúth, J.; Bíliková, K.; Kováčová, E.; Kuzmová, Z.; Schroder, W. (2004) Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- α is a regular component of honey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 52. p. 2154-2158.

Sparbier, K.; Koch, S.; Kessler, I.; Wenzel, T.; Kostrzewa M. (2005) Selective isolation of glycoproteins and glycopeptides for MALDI-TOF MS detection supported by magnetic particles. *Journal of Biomolecular Techniques*. v. 16. p. 407-443.

Tokunaga, K.H.; Yoshida, C.; Suzuki, K.M.; Maruyama, H.; Futamura, Y.; Araki, Y.; Mishima, S. (2004) Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. v. 27. p. 189-192.

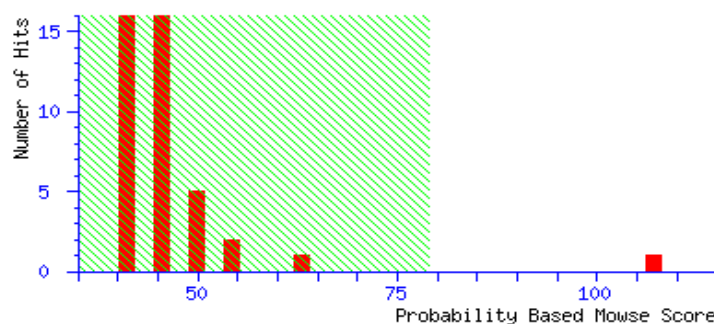
Wang, L.; Li, F.; Sun, W.; Wu, S.; Wang, X.; Zhang, L.; Zheng, D.; Wang, J.; Gao, Y. (2006) Concanavalin A-captured glycoproteins in healthy human urine. *Molecular & Cellular Proteomics*. v. 5. p. 560-562.

Yonekura, M. (1998) Characterization and physiological function of royal jelly proteins. *Honeybee science*. v. 19. p. 15-22.

Anexos

1. Análise de bioinformática dos polipeptídeos de geléia real brasileira (GRB) isolados por cromatografia de afinidade de ConA e eletroforese SDS-PAGE 1D

Figura 03. Informações para identificação do polipeptídeo B1: Identificação da proteína e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)



Concise Protein Summary Report

Format As	Concise Protein Summary	Help
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
20		
Re-Search All	Search Unmatched	

1.	gi 58585142	Mass: 61966	Score: 107	Expect: 8.9e-05	Queries matched: 8
	major royal jelly protein 3 [Apis mellifera]				
	gi 56422035	Mass: 66055	Score: 106	Expect: 0.00011	Queries matched: 8
	major royal jelly protein 3 [Apis mellifera carnica]				
	gi 1079192	Mass: 53155	Score: 97	Expect: 0.00083	Queries matched: 7
	royal jelly protein RJP57-1 - honeybee				

Figura 04. Informações para identificação do polipeptídeo B2: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, sequência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

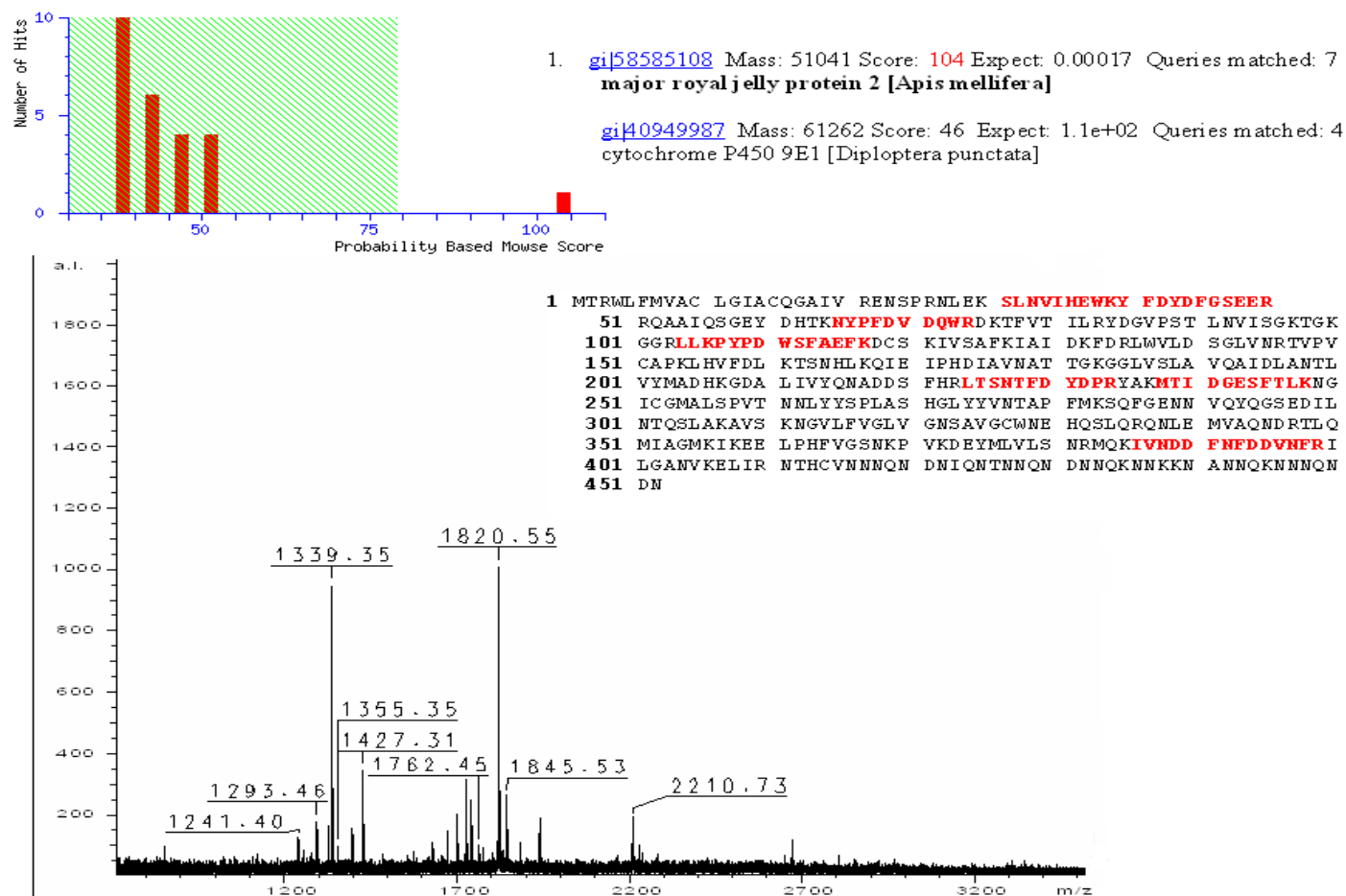


Figura 05. Informações para identificação do polipeptídeo B3: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, seqüência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

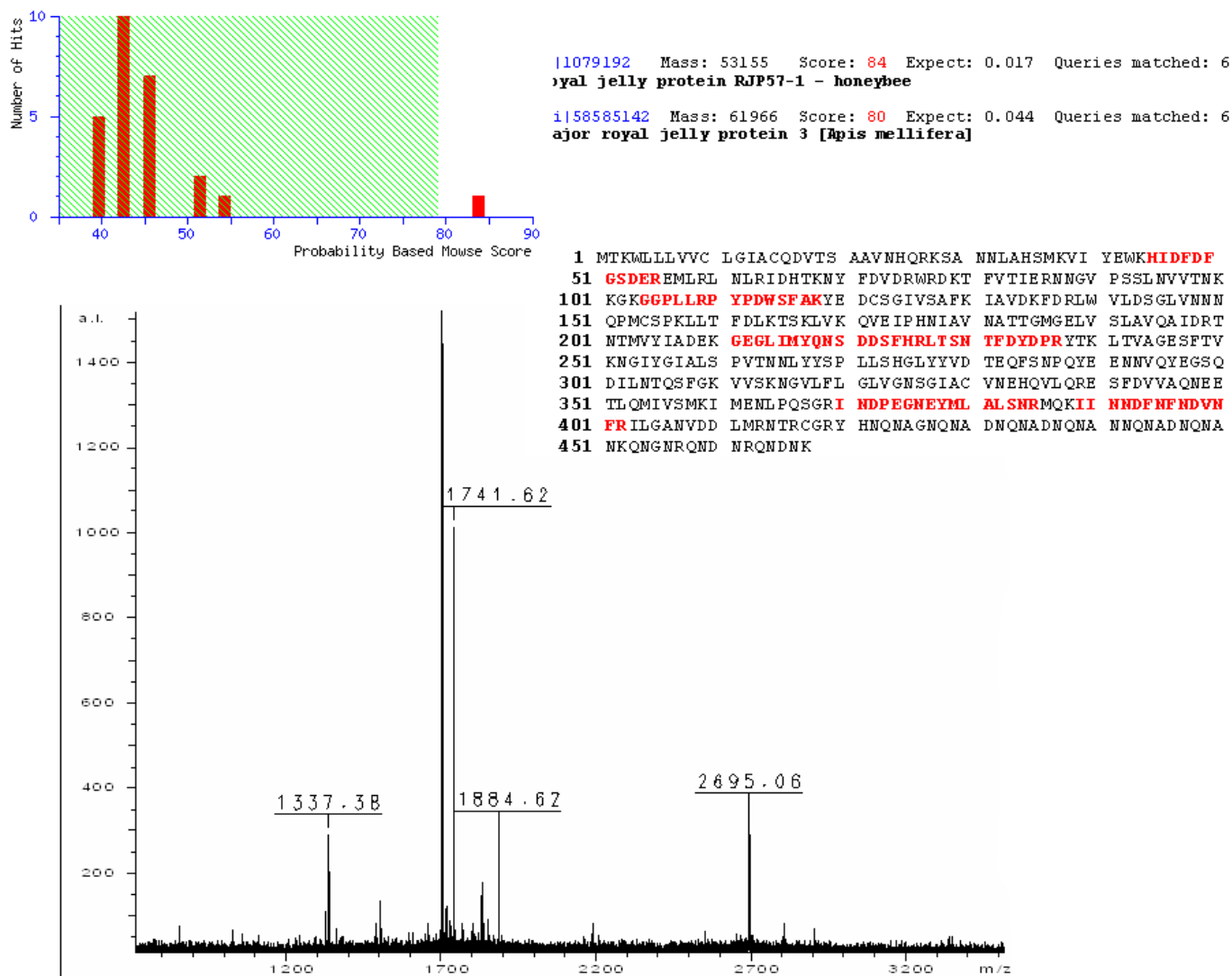


Figura 06. Informações para identificação do polipeptídeo B4: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, sequência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

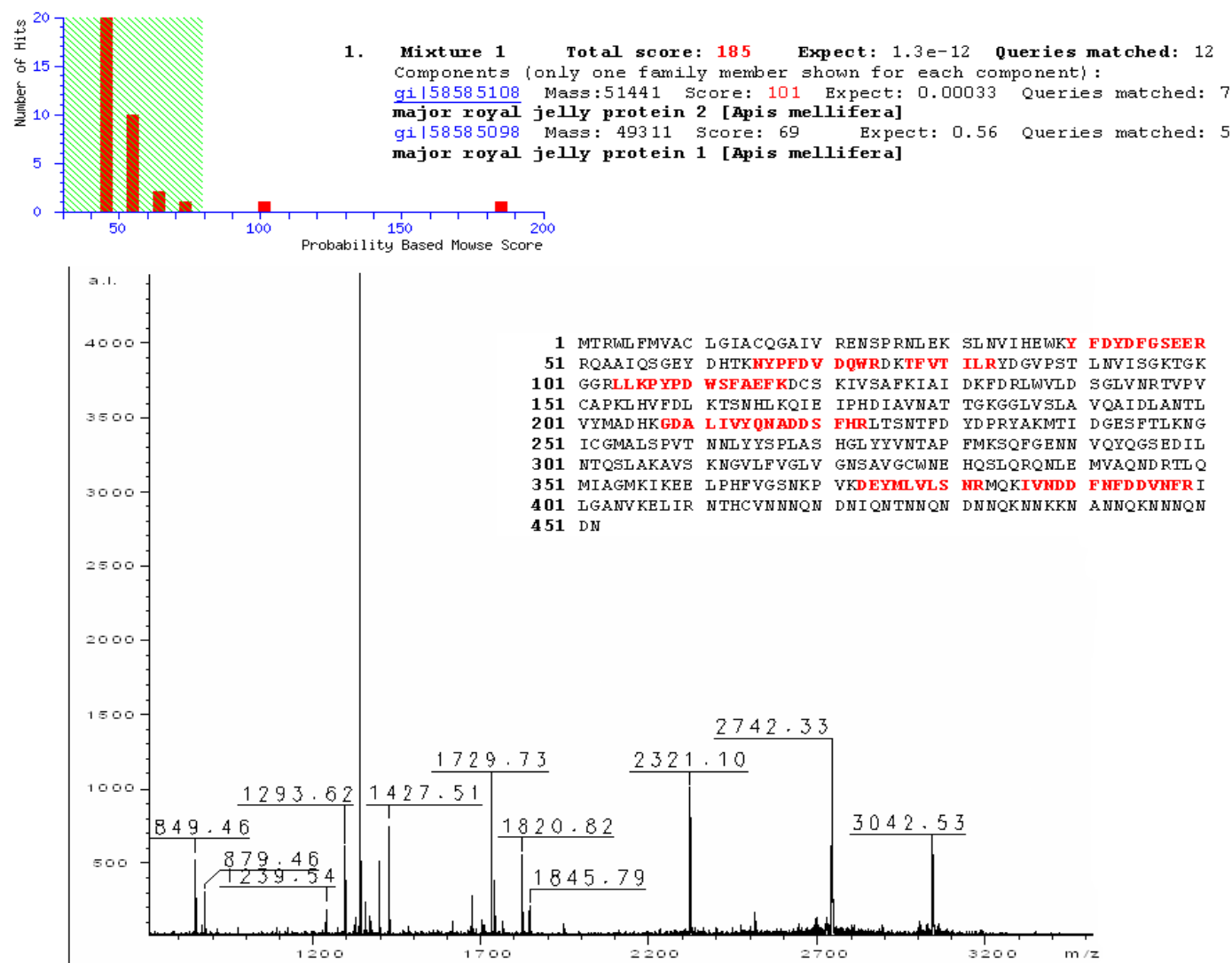


Figura 07. Informações para identificação do polipeptídeo B5: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, seqüência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

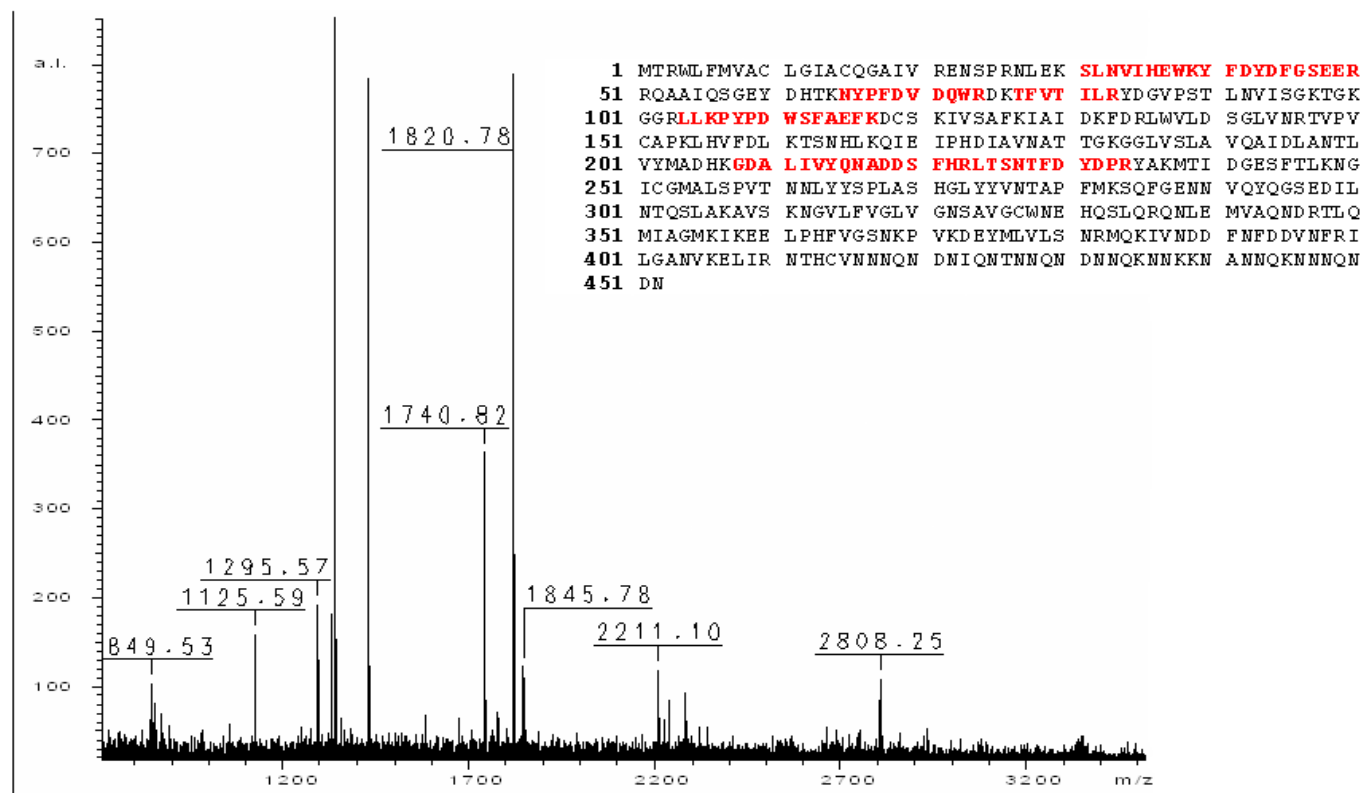
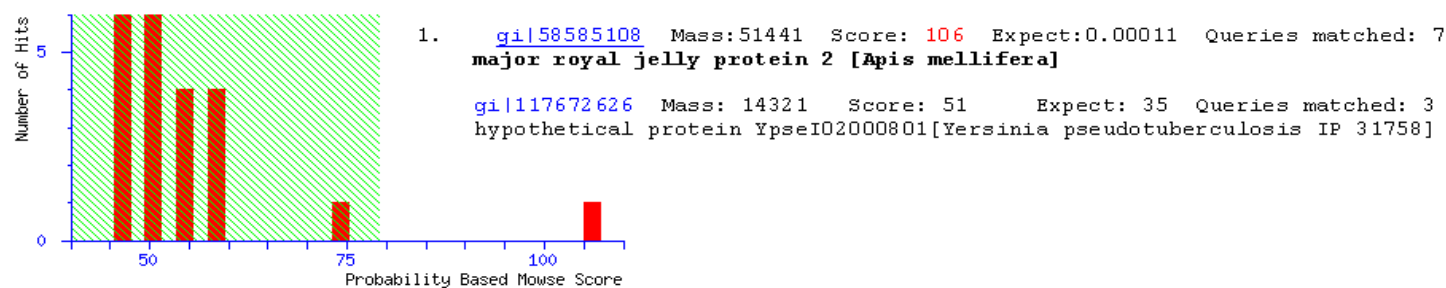
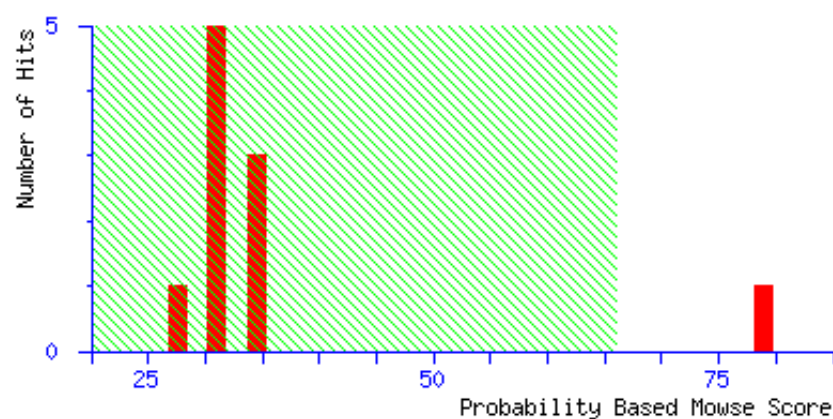


Figura 08. Informações para identificação do polipeptídeo B7: Identificação da proteína e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)



Concise Protein Summary Report

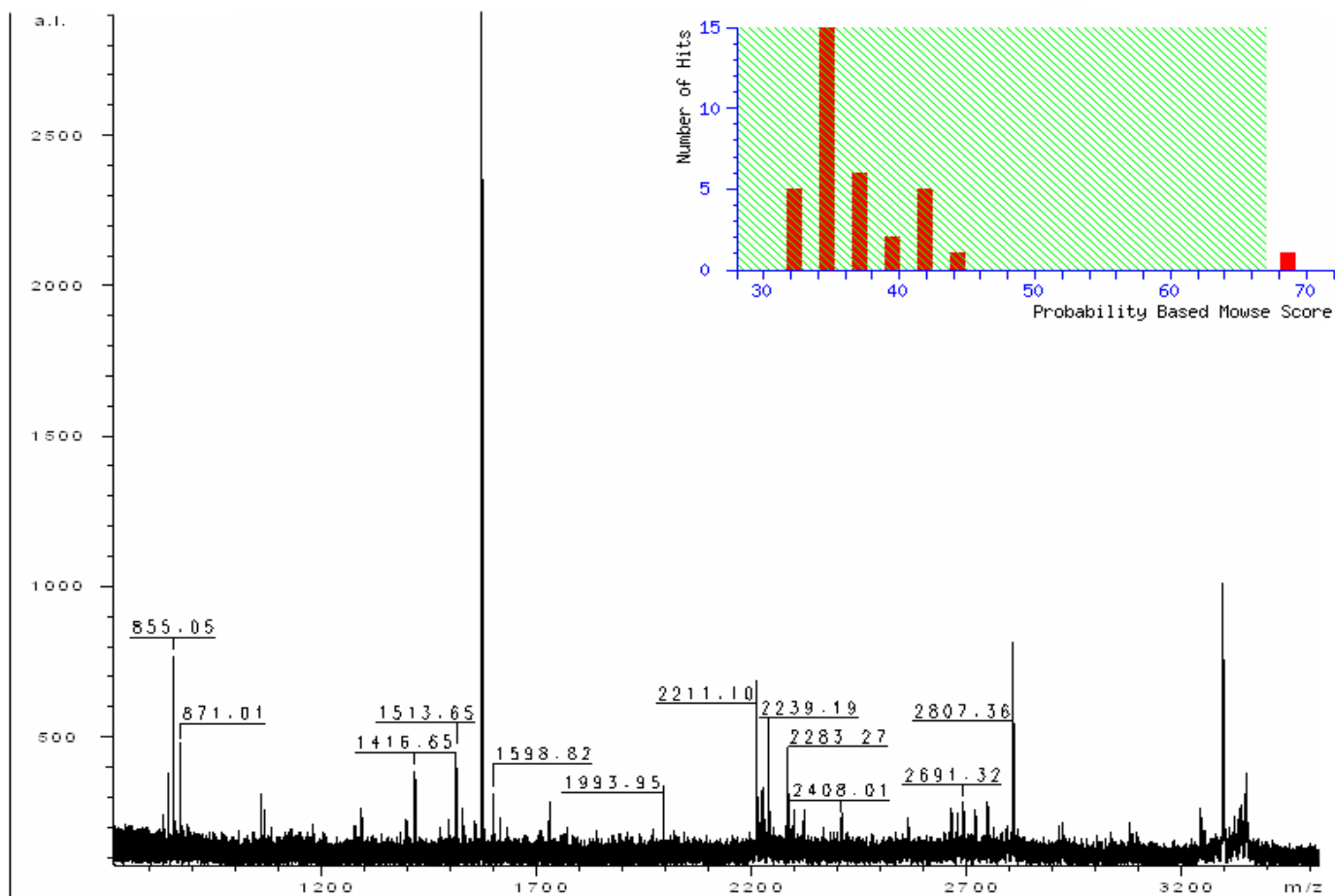
Format As	Concise Protein Summary ▼	Help
Significance threshold p<		0.05
Max. number of hits		20

Re-Search All	Search Unmatched
---------------	------------------

- [gi|58585108](#) **Mass:** 51441 **Score:** 79 **Expect:** 0.0026 **Queries matched:** 6
 major royal jelly protein 2 [Apis mellifera]

Figura 09. Informações para identificação do polipeptídeo B9: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, sequência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

1. **O18330** Mass: 49331 Score: **69** Expect: 0.04 Queries matched: 6
(MRJP1_APIME) Major royal jelly protein 1 precursor **(MRJP-1)** (Bee-milk protein) [Contains: Jellein-1 (Jelleine-I); Jellein-2 (Jelleine-2); Jellein-4 (Jelleine-IV)]



2. Análise de bioinformática dos polipeptídeos de geléia real chinesa (GRC) isolados por cromatografia de afinidade de ConA e eletroforese SDS-PAGE 1D

Figura 10. Informações para identificação do polipeptídeo C1: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, sequência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

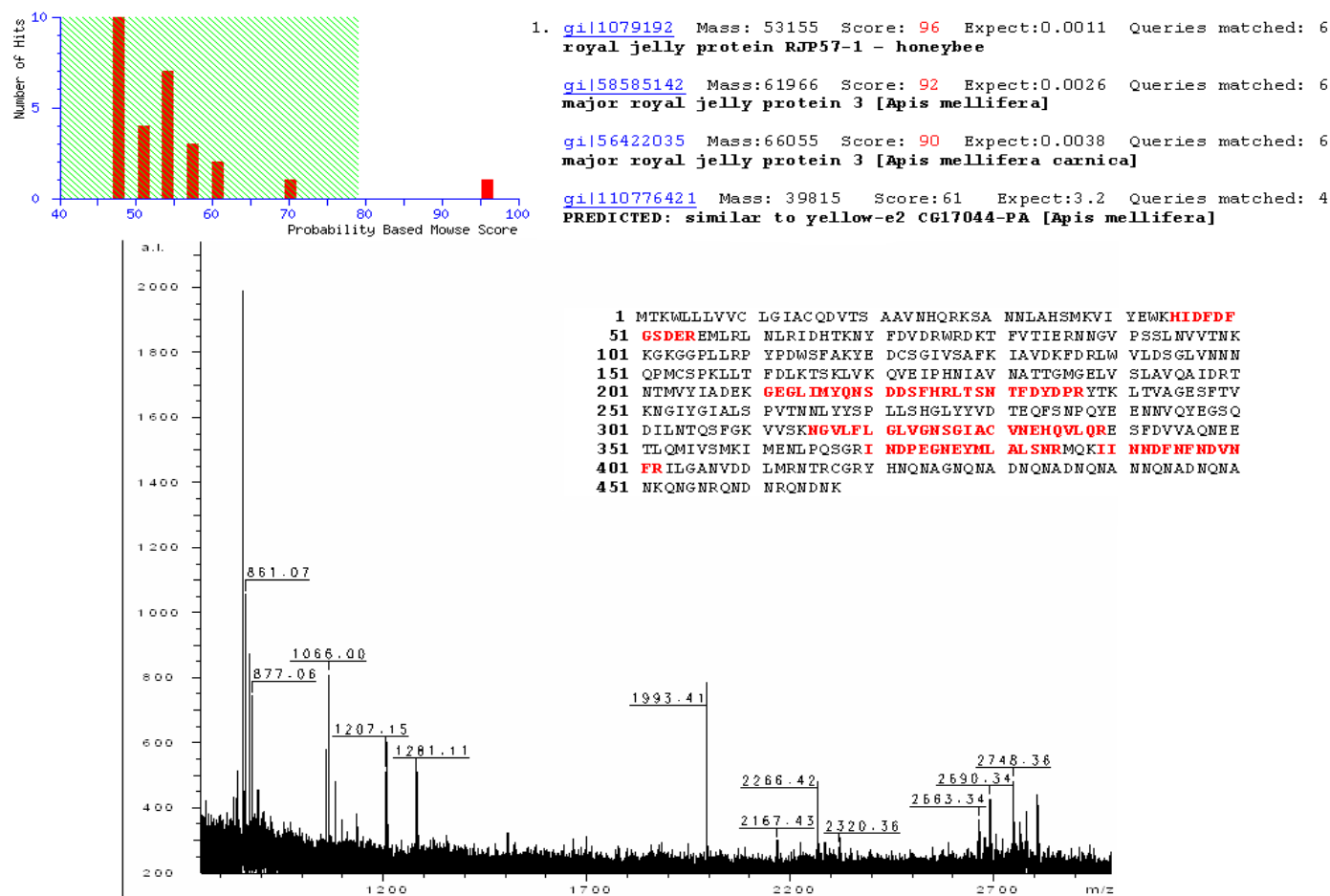


Figura 11. Informações para identificação do polipeptídeo C2: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, sequência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

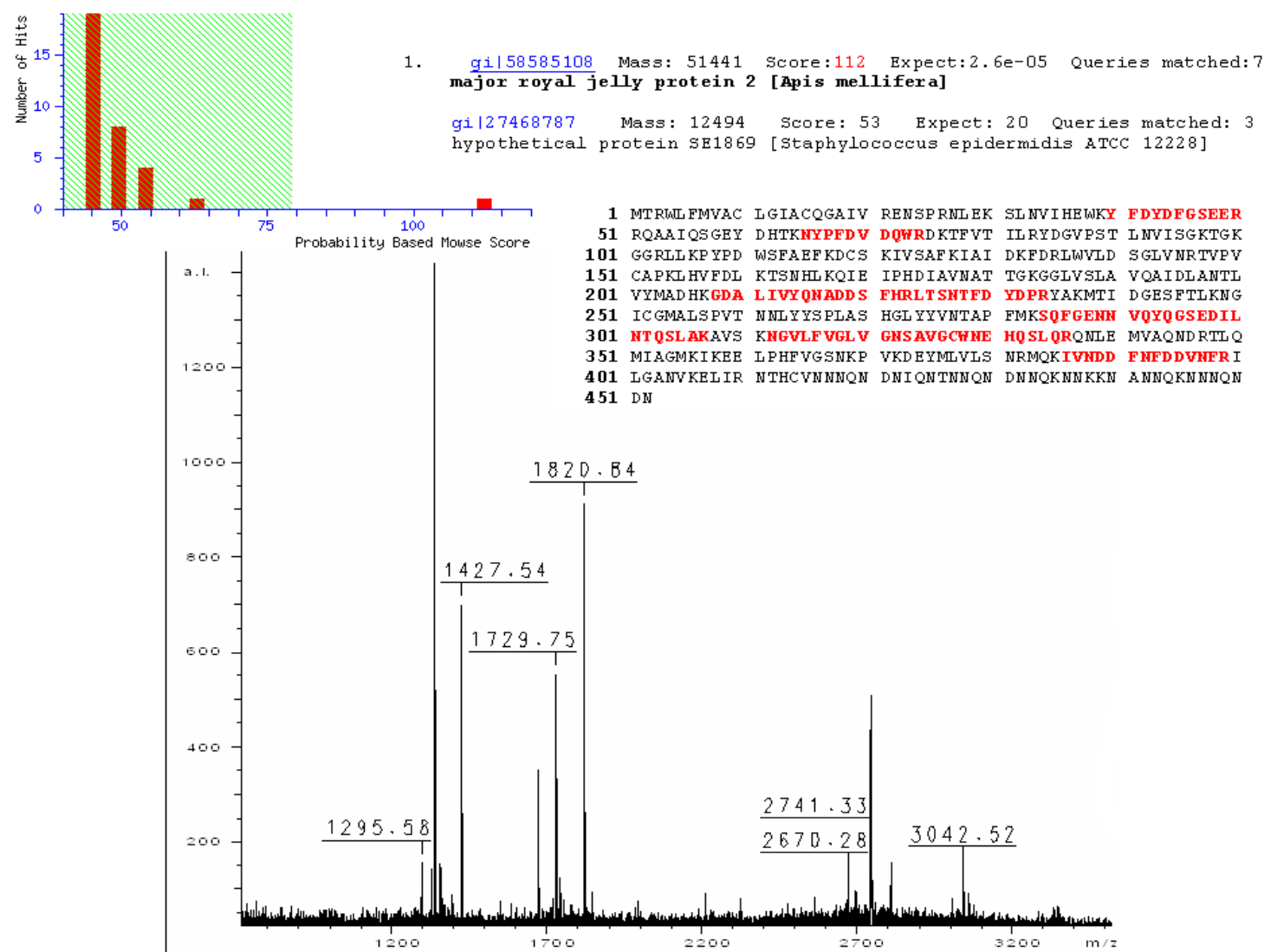


Figura 12. Informações para identificação do polipeptídeo C3: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, sequência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

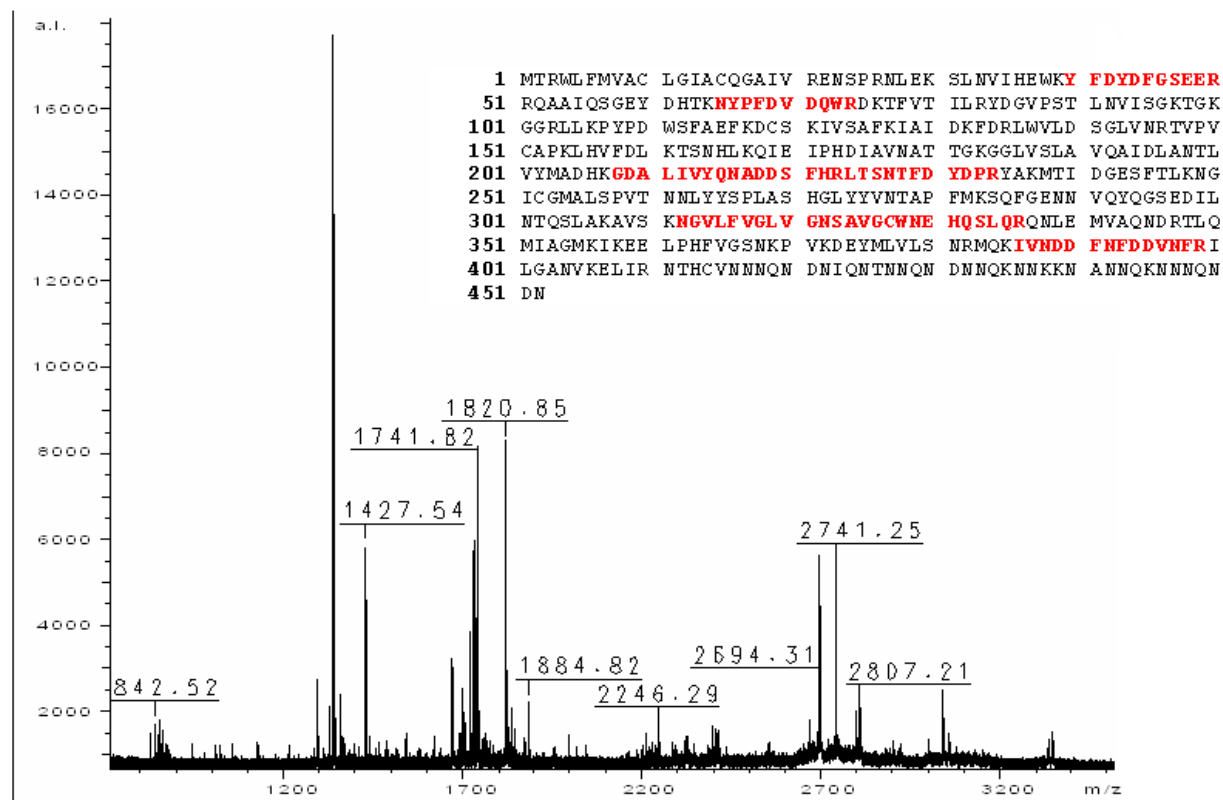
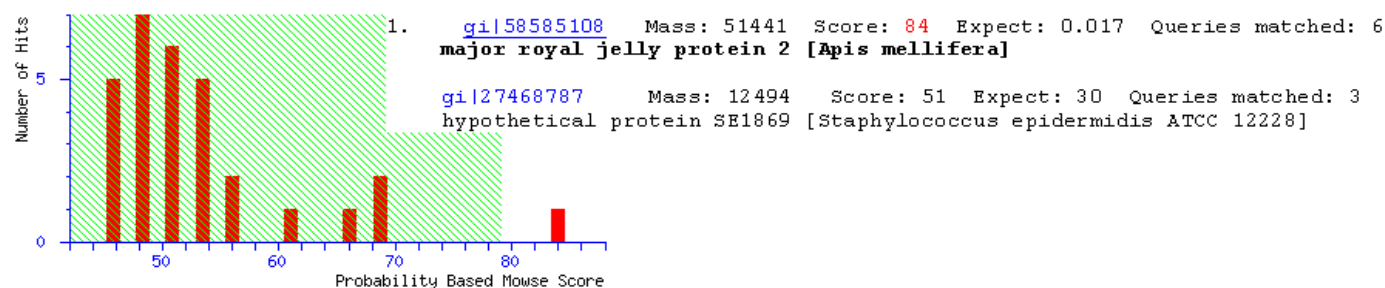


Figura 13. Informações para identificação do polipeptídeo C4: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, seqüência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

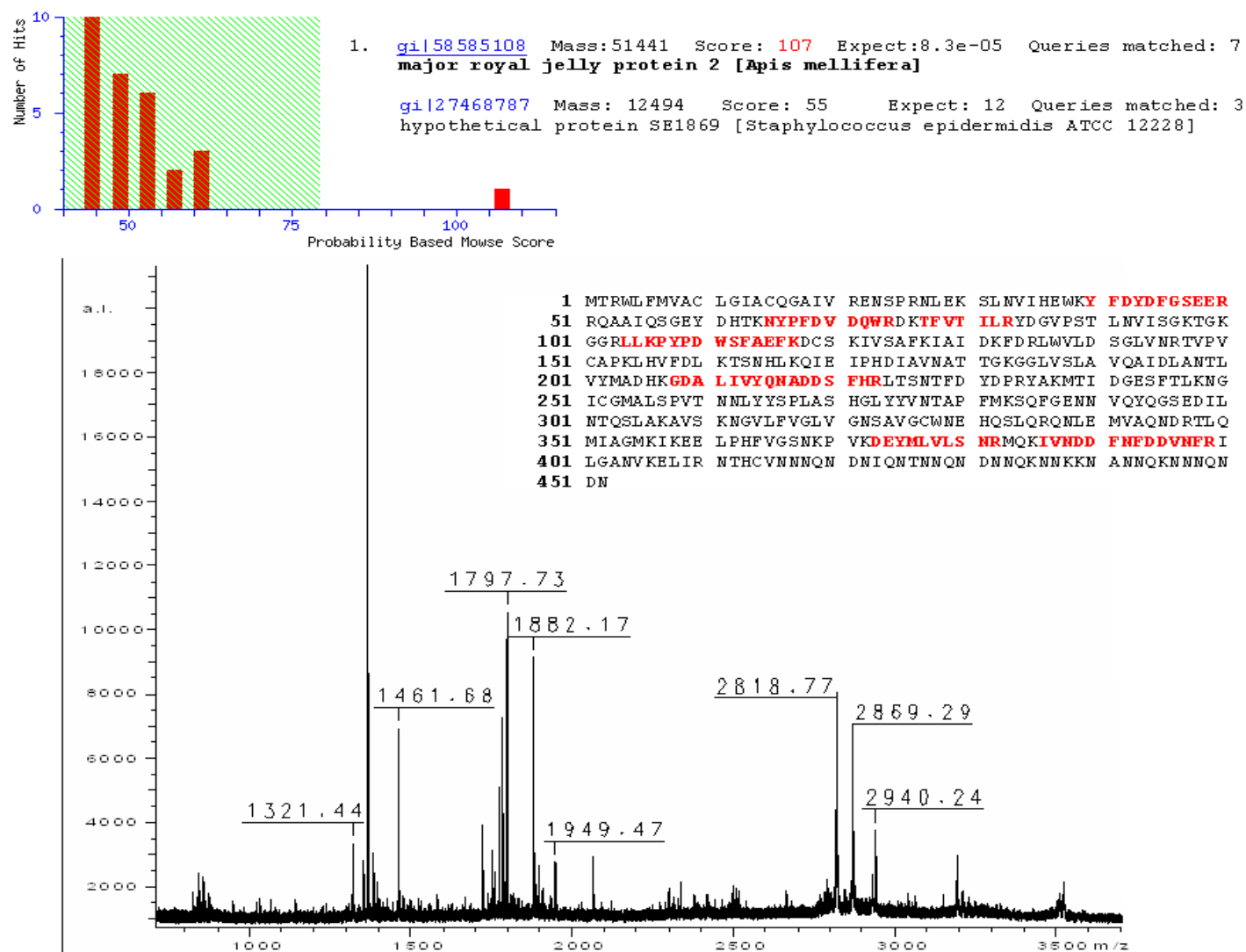
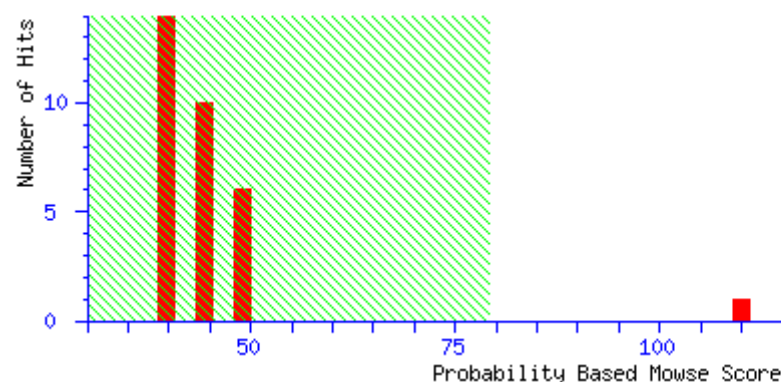


Figura 14. . Informações para identificação do polipeptídeo C5: Identificação da proteína e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold p< Max. number of hits

- [gi|58585142](#) **Mass:** 61966 **Score:** 110 **Expect:** 4.5e-05 **Queries matched:** 9
major royal jelly protein 3 [Apis mellifera]

[gi|56422035](#) **Mass:** 66055 **Score:** 108 **Expect:** 7.1e-05 **Queries matched:** 9
major royal jelly protein 3 [Apis mellifera carnica]

[gi|1079192](#) **Mass:** 53155 **Score:** 99 **Expect:** 0.00052 **Queries matched:** 8
royal jelly protein RJP57-1 - honeybee

Figura 15. Informações para identificação do polipeptídeo C6: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, sequência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

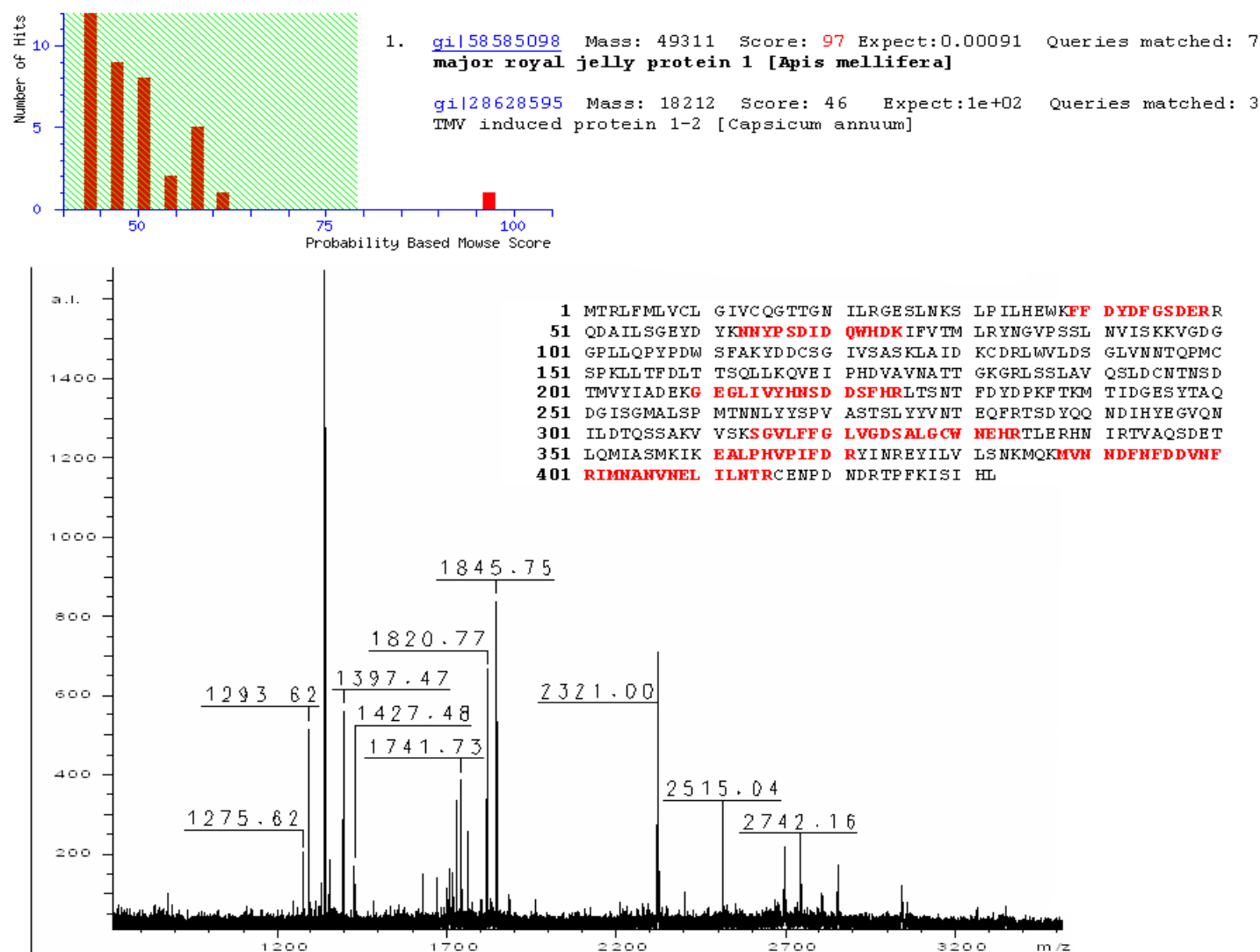


Figura 16. Informações para identificação do polipeptídeo C7: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, seqüência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

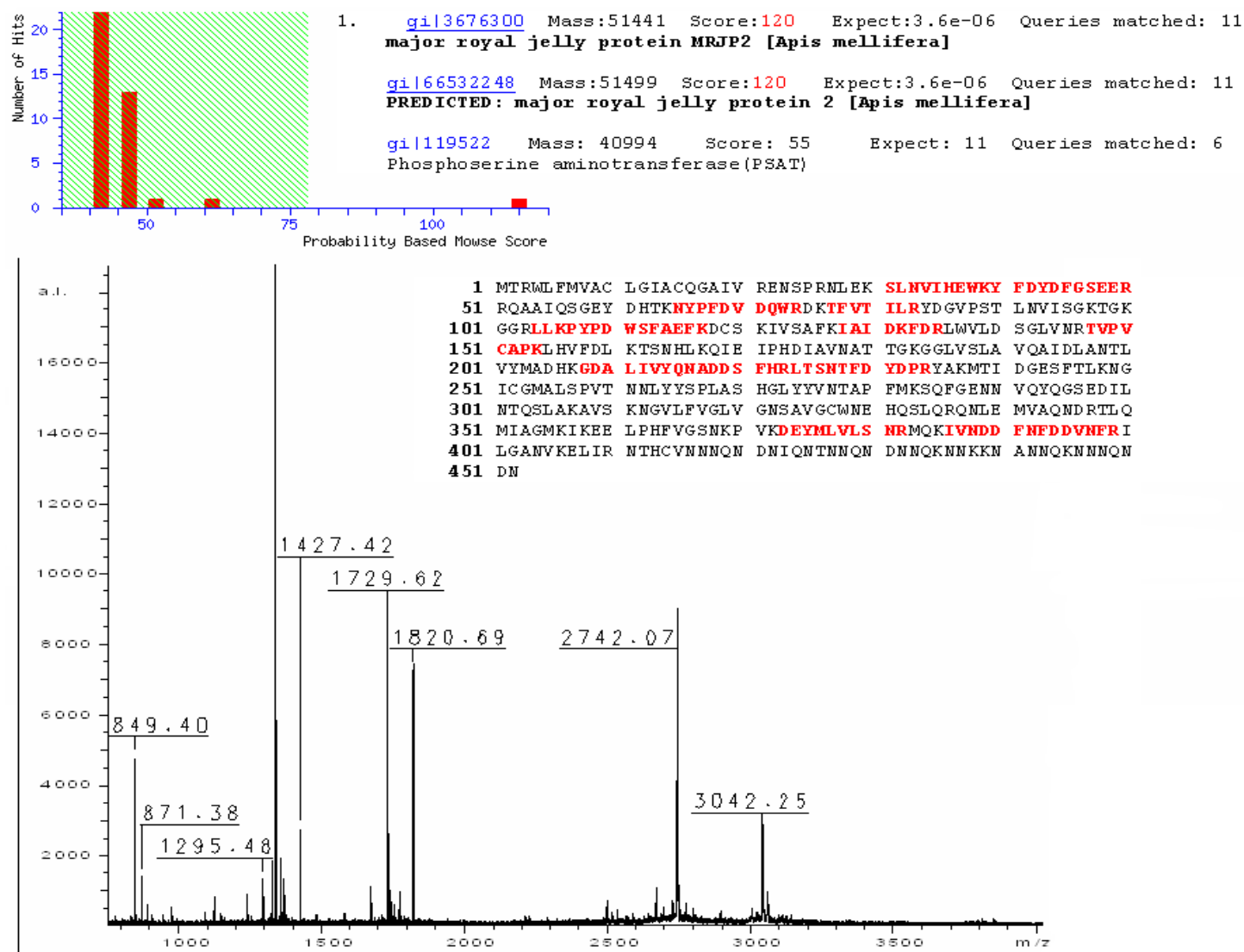


Figura 17. Informações para identificação do polipeptídeo C8: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, sequência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

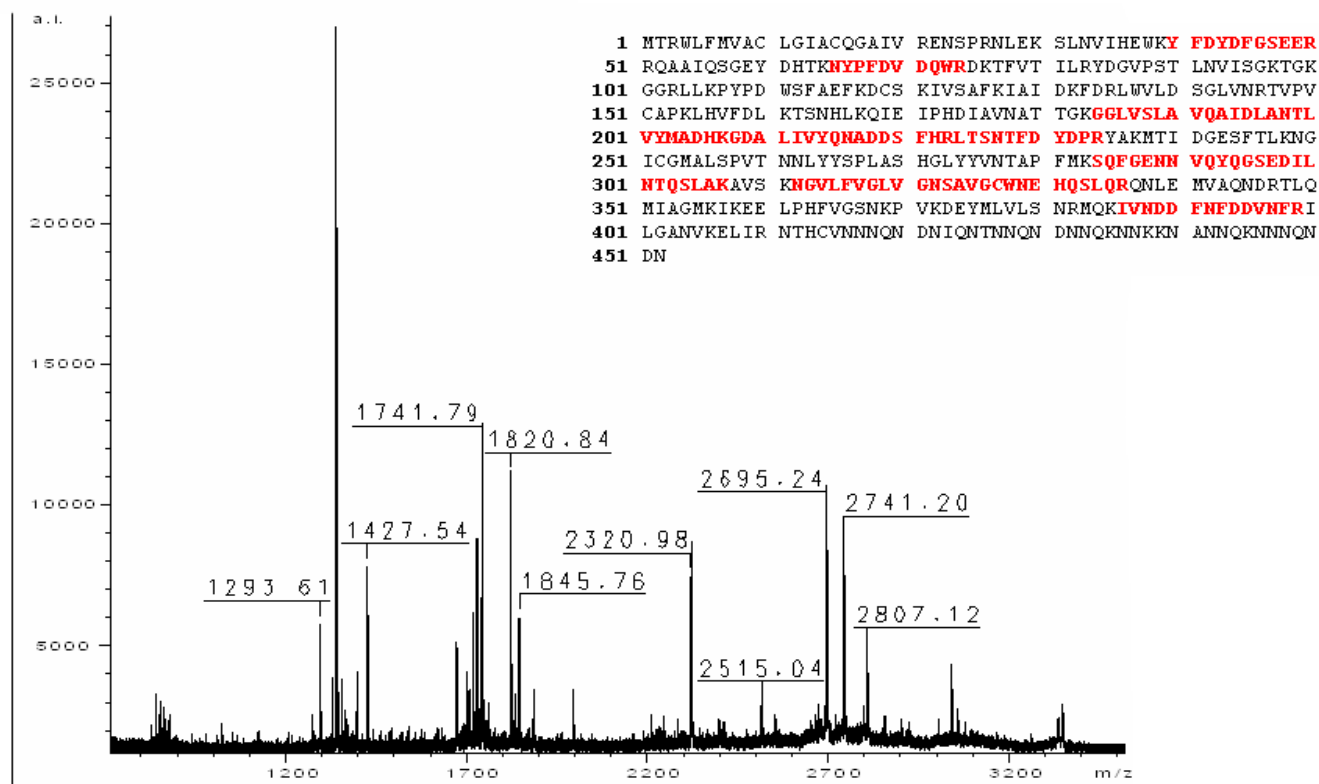
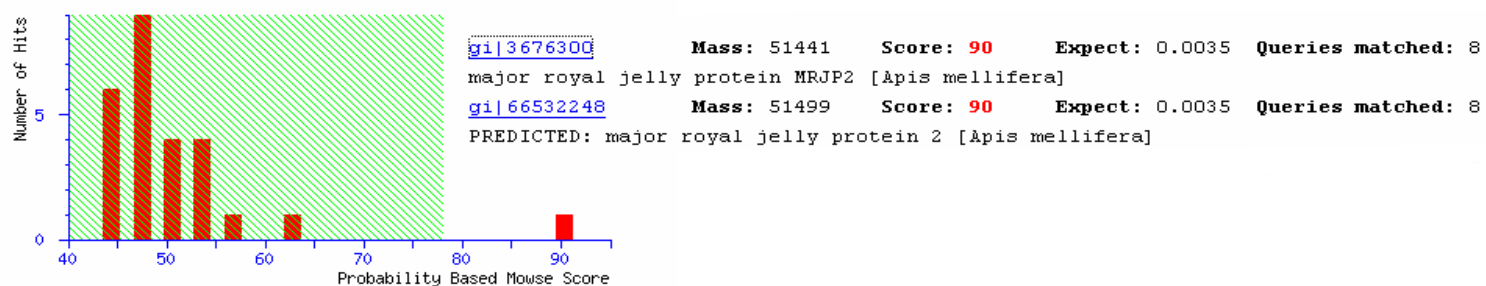


Figura 18. Informações para identificação do polipeptídeo C9: Espectro MALDI-TOF MS, identificação da proteína, sequência primária indicando os fragmentos identificados (em vermelho) e gráfico em barras da probabilidade de erro na identificação (servidor Mascot)

