

INTERAÇÃO DA MELITINA DO VENENO DE *Apis mellifera* EM PROTEÍNAS DA ZONA PELÚCIDA DE MAMÍFEROS: UMA ABORDAGEM *in silico*

Francisco Dantas Lourenço¹

Gabriel Acácio de Moura²

Alúcio Marques da Fonseca³

Larissa Deadame de Figueiredo Nicolete⁴

RESUMO

Contexto: As técnicas de fertilização *in vitro* encontram desafios e paradigmas para a garantia do aumento das taxas de fertilização. Diante disso, torna-se relevante a busca por ativos que atuam propiciando respostas em células germinativas como é o caso do peptídeo melitina que possui indícios de aplicabilidade na literatura para este propósito. Objetivo: Este trabalho busca avaliar através de metodologias computacionais características biológicas, físico-químicas e estruturais da melitina e verificar suas interações por docking molecular com a proteína 3D4G. Resultados: O peptídeo demonstrou Peso molecular de 2904.5 g/mol, certa solubilidade em água, em alguns modelos ser mais seguro no que diz respeito à toxicidade do que alguns grupos controles avaliados, a estrutura da melitina demonstrou ser passível de interação com a proteína 3D4G pelo docking, com pontes salinas e ligações de hidrogênio além de uma possível atuação como modulador de cálcio de acordo com I-Tasser. Conclusão: Pode-se inferir uma potencial interação da melitina na proteína 3D4G, sugerindo possível ação em oócitos de mamíferos.

Palavras-chave: Apitoxina. Docking molecular. Toxicidade.

¹ Discente do Curso de Bacharelado em Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira. E-mail: lourenco.dantas@aluno.unilab.edu.br

² Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Campus Porangabussu. E-mail: gabrielacacioed@gmail.com

³ Docente do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira. E-mail: aluisiomf@unilab.edu.br

⁴ Orientadora. Docente do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira. E-mail: larissanicolete@unilab.edu.br

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	3
2 METODOLOGIA.....	4
2.1 Preparação da melitina para análise <i>in silico</i>.....	4
2.2 Predição <i>in silico</i> das características físico-químicas da melitina.....	4
2.3 Avaliação da ecotoxicidade do peptídeo no ambiente.....	5
2.4 Análise de ramachandran.....	5
2.5 Docking molecular com cluspro 2.0.....	5
3 RESULTADOS.....	6
3.1 Avaliação físico-química.....	6
3.2 Avaliação ADME/tox.....	6
3.3 Avaliação ecotox.....	7
3.4 Modelagem de peptídeo e proteínas.....	7
3.5 Análise de ramachandran.....	8
3.6 Docking molecular e ligação de aminoácidos.....	8
4 TABELAS E FIGURAS.....	8
5 DISCUSSÃO.....	11
6 CONCLUSÃO.....	14
REFERÊNCIAS.....	15

1 INTRODUÇÃO

As Técnicas de reprodução assistida (TRA's) são tratamentos que incluem o manuseio de oócitos, espermatozóides, ou embriões, *in vitro* para promoção da gestação, abrangendo uma variedade de procedimentos, como a fertilização *in vitro* (FIV), Injeção Intra-Citoplasmática de espermatozóide (ICSI) (ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2009). A FIV se destaca como uma técnica ofertada por clínicas para pessoas com problemas de fertilidade que buscam sucesso reprodutivo (KUSHNIR; SMITH; ADASHI, 2022). Acredita-se que cerca de 8 milhões de bebês no mundo nasceram graças a técnicas reprodutivas (MARTE MYHRE; RITSA, 2019). Contudo, existem desafios ainda na FIV, em pesquisas já foi identificado uma taxa de sucesso de apenas 47% em mulheres mais jovens que caía para valores entre 22% a 33% na faixa etária de 40 (STEWART et al., 2011).

Entre os agentes envolvidos na reprodução existem as glicoproteínas da zona pelúcida (GZPs) de oócitos em mamíferos são proteínas extracelulares localizadas na parte extracelular da membrana plasmática de oócitos (WEADICK, 2020), essas proteínas possuem subunidades como a ZP3 e funções como acoplamento do espermatozóide e óvulo durante a fecundação e atua diretamente na ativação, bloqueio da poliespermia e adesão dos gametas (NIXON; AITKEN; MCLAUGHLIN, 2007). Portanto, devido a suas funções essas tornam-se de extrema importância no processo de fecundação podendo ser extensivamente exploradas para melhoria das técnicas de reprodução *in vitro* (PAUL M. WASSARMAN, 1988).

Na literatura existem estudos onde o peptídeo melitina com ácido aracônico atuando na ativação oocitária em sapos-da-areia graças a seu estímulo à enzima fosfolipase 2 (PLA2) (AJMAT et al., 2012)) Além disso, atividades desse peptídeo no fator de estimulação a prostaglandina f2a (PGF2a) em modelos mamíferos também já foram identificadas (BERTAN et al., 2006)

A melitina é composta por 27 aminoácidos (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG) tendo uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica (AL-SAMIE; ALI, 2012) e é um dos responsáveis pelas funções antibacterianas e antivirais da apitoxina (SFORCIN et al., 2022). Esta que se trata do veneno de abelha que é um composto que diversas obras já demonstraram funcionalidades no tratamento de enfermidades, pode-se citar, por exemplo, efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e até mesmo estudos para tratamento de Parkinson

(SFORCIN et al., 2022). Diferentes substâncias o compõem, entre elas diversas aminas, enzimas e peptídeos como a melitina, que se destaca por sua grande presença.

Lamentavelmente, estudos reprodutivos encontram dificuldades, pois para ensaios *in vitro* oócitos são necessários e existem limitações para obtenção de ovários de abatedouros de animais (ALEJANDRO et al., 2016). Além do fato que nem todos os oócitos possuem a qualidade necessária para estudos de desenvolvimento *in vitro* (4)

Dessa forma, meios computacionais podem promover e facilitar estudos com tais células reprodutivas. No campo de atuação da bioinformática, ocorre a integração de diversas disciplinas com o propósito de analisar e interpretar dados biológicos. Estes, por sua vez, aplicam algoritmos provenientes de várias áreas da computação, como inteligência artificial, modelagem e simulação, no intuito de realizar análises que resultem em informações relevantes na área biológica (DALL-ALBA; NOTARI; SILVA, 2020). Para tanto o presente trabalho tem como objetivo verificar *in silico* a capacidade da melitina interagir com as ZPs, bem como suas características físico-químicas.

2 METODOLOGIA

2.1 Preparação da melitina para análise *in silico*

Primeiramente, foi feita uma busca no Genbank da National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e uma procura da sequência fasta da melitina, com obtenção da sequência ocorreu a tradução através do blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para obtenção da sequência de aminoácidos. O software ChemSketch foi utilizado para obter o código smiles da molécula do peptídeo que será utilizado nas análises posteriores. Com a sequência de aminoácidos obtida utilizamos a mesma na plataforma I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER>) para obtenção de informações de ligantes, funções biológicas e estrutura molecular para realização de comparação de dados e de estruturas obtidas com aqueles presentes na Protein Data Bank - PDB (<https://www.rcsb.org>) esta última que também forneceu dados da sequência nucleotídica da proteína 3D4G.

2.2 Predição *in silico* das características físico-químicas da melitina

O servidor web Pep-Calc (<https://pepcalc.com>) foi utilizado para obtenção das características físico-químicas como peso molecular, ponto isoelétrico, coeficiente de extinção, carga líquida

em pH 7 e solubilidade. Já a predição de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADME/tox) ocorreu através do servidor web pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm>) fornecendo também dados sobre permeabilidade em Caco2, permeabilidade na pele, substrato de CYP3A4, depuração total, hepatotoxicidade, toxicidade em *T.Pyriiformis*, Inibidor da glicoproteína P, toxicidade água/crônica oral em ratos, dose máxima tolerada em humanos e permeabilidade na barreira hematoencefálica. Foi utilizado o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o antimicrobiano ionomicina como controle, através do código smiles obtidos na plataforma pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), de código 62819 e 6912226, respectivamente. Ambos utilizados, tanto para Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADME/tox) em pkCSM quanto para as avaliações listadas no tópico 2.3.

2.3 Avaliação da ecotoxicidade do peptídeo no ambiente

Utilizamos o software VEGA-HUB (versão 1.2.3) para realizar predições *in silico* relacionadas aos potenciais impactos ambientais. O software conduziu cálculos para determinar os parâmetros de persistência no solo e na água, e avaliou a toxicidade crônica em organismos da fauna e flora marinha. Podendo citar, por exemplo, efeitos de irritação na pele, irritação nos olhos, aberrações cromossômicas, efeitos em receptores de estrogênio, receptores androgênicos, disruptor endócrino e atividades em organismos marinhos como *Daphnia Magna*, peixes, algas e ligações com proteínas plasmáticas.

2.4 Análise de ramachandran

Para avaliar estereoquímica de uma estrutura de proteína ao analisar a geometria de cada resíduo individualmente, assim como a geometria global da estrutura como um todo, buscando visualizar pontos maleáveis na conformação dos resíduos de aminoácidos das cadeias do peptídeo melitina e da proteína alvo, utilizou-se a plotagem Ramachandran da plataforma UCLA-DOE LAB — SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu>) da Universidade da Califórnia, Los Angeles, que expõe através de um gráfico as regiões com conformações permitidas ou proibidas.

2.5 Docking molecular com cluspro 2.0

Foi utilizada a base de dados PDB (<https://www.rcsb.org>) para obtenção da glicoproteína ZP3 de código 3D4G, sequência fasta desta que serviu para modelagem e como alvo para avaliação de interações com o peptídeo melitina.. Na realização do procedimento do docking

molecular será utilizado o web server ClusPro (<https://cluspro.bu.edu>) onde se realizará o “docking cego” ou seja, sem a indicação de sítios de ligação. Será avaliado os 10 melhores sistemas conformacionais de acordo com o software, buscando aqueles com resultados energéticos mais baixos nas ligações e comparar cada um utilizando a visualização 3D no pymol para assim obter o sistema que mais se aproxima da realidade. Para análise de ligações entre os aminoácidos foi utilizado o banco de dados PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>) que após o envio dos modelos de docking indicou as interações entre os resíduos.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação físico-química

Conforme aplicação do código de aminoácidos da melitina utilizado no modelo para avaliação de propriedades, observa-se na tabela 1 destacando a baixa solubilidade em água do peptídeo. O peso molecular de 2904.5 g/m condiz com a maior quantidade de resíduos (27). Ademais, distinções como do ponto isoelétrico da melitina em pH 12.18, carga em pH 7 em 5 da melitina indicam parâmetros elétricos que devem ser considerados em ensaios *in vitro*. Em relação ao coeficiente de extinção 5690 M⁻¹cm⁻¹ indicando maior capacidade de absorção de luz caso estejam em concentrações no caminho óptico iguais. Na modelagem da melitina pelo I-tasser, o software indicou possíveis ligantes e funções biológicas, entre elas ligações com ácidos nucleicos, como ligante de íons-metálicos (como cálcio, magnésio e zinco) e atividade catalítica.

3.2 Avaliação ADME/tox

Avaliou-se a absorção considerando como parâmetro inicial a permeabilidade Caco2, foi observado na tabela 2 que a melitina e a ionomicina são pouco absorvidas, se comparadas ao FSH. Uma baixa absorção cutânea foi visualizada do peptídeo e grupos controles. Na absorção intestinal, segundo as predições em porcentagem, tanto a melitina quanto o FSH não são absorvidos, em contrapartida a ionomicina é absorvida com valor acima de 46%. A melitina pode ser carregada pelo substrato de P-glicoproteína. Destaca-se também o fato de que a melitina e o FSH não são inibidores das Glicoproteínas I e II. Em relação a distribuição, a melitina é menos permeável que os controles na barreira hematoencefálica (BHE) e no sistema nervoso central (SNC). No que diz respeito a metabolização, foi previsto que não ocorre inibição do citocromo P450. Além disso, nem o peptídeo nem os controles são

metabolizados pela isoforma CYP2D6, apenas melitina e ionomicina pela CYP3A4. A toxicidade foi avaliada inicialmente, pela toxicidade oral aguda em ratos (LD50) onde indicou-se que uma quantidade maior do peptídeo (2.482 mol/kg) se comparado a ionomicina. Também em comparação a este, observou-se uma maior quantidade de mg/kg (13.049) em relação aos 1.886 mg/kg da ionomicina que oferece toxicidade crônica em ratos. A sensibilidade cutânea não foi observada, todavia hepatotoxicidade foi identificada na melitina e em ambos controles. Por fim, identificou-se toxicidade de todos os peptídeos testados no protozoário *T.pyriformis* inibindo seu crescimento, mas ausência da toxicidade da melitina e do FSH em peixes *Fathead minnow*.

3.3 Avaliação ecotox

De acordo com as avaliações do modelo presentes na tabela 3, a melitina não possui toxicidade no desenvolvimento reprodutivo, semelhante a ionomicina. Ademais, nem o peptídeo nem os controles tiveram efeitos responsivos aos receptores mediadores de estrogênio e androgênio, e nem afinidade ao primeiro citado. Na avaliação, todos obtiveram classificação III na escala Cramer, servindo de parâmetro para verificações extras de toxicidade, que ocorreram com avaliações de toxicidade aguda e crônica em organismos marinhos e terrestres. Primeiramente avaliou-se EC50 em *Daphnia magna*, onde foi previsto que doses de 0.2182 mg/l, seriam possíveis letais a 50% de uma população, em contrapartida a níveis de toxicidade crônica 4.93 mg/l, ambos valores nesta espécie ficaram medianos se comparados aos controles. Tratando de toxicidade em algas e peixes, foi observado que em sua maioria concentrações mais altas de melitina para promoção de efeitos agudos e crônicos se comparados aos grupos controle. O mesmo se deu para minhocas, modelo animal utilizado para avaliação terrestre. Por fim, em avaliação ambiental o modelo indicou dificuldade na biodegradação, servindo de alerta ao descarte inapropriado.

3.4 Modelagem de peptídeo e proteínas

A princípio, a plataforma PDB seria a fonte para os modelos do peptídeo e proteínas, contudo ao encontrar não conformidades estruturais, decidiu-se realizar modelagem através do I-Tasser, para comparar com as estruturas obtidas do PDB a fim de garantir maior qualidade na docagem. Na figura 2 foi utilizado o software pymol (versão 2.5.8) realizou alinhamento de ambas para verificar semelhanças foi comparado às estruturas da proteína 3D4G e foram identificadas divergências, com um valor RMSD igual a 0.756 (2659 atoms) uma vez que valores aproximados a 0 sugerem igualdade estrutural.

3.5 Análise de ramachandran

Na plotagem de Ramachandran que pode ser visualizada na figura 2, verificamos a flexibilidade estrutural do peptídeo e proteínas utilizadas buscando verificar as possibilidades de interações. Nas regiões vermelhas temos as áreas com aminoácidos mais favoráveis, em amarelo as mais permissivas, em bege as permissivas e as regiões brancas indicam áreas não-maleáveis. Obteve-se na melitina um resultado 95.45% somando regiões favoráveis (72,7%) com as regiões permitidas e a proteína 3D4G, de 96,9% somando suas regiões favoráveis (80,5%) com as permitidas (16.4%).

3.6 Docking molecular e ligação de aminoácidos

Os dockings foram realizadas no ClusPro 2.0 indicaram sobreposições dos aminoácidos da melitina com os da proteína 3D4G, foram selecionados dois modelos para obtenção de imagens conforme a figura 3 e os dados daqueles com menor energia foram coletados, onde obteve-se um valor de energia de -906.3 para o modelo 0 e -866.8 para o modelo 1. As verificações de ligações de aminoácidos foram realizadas e podem ser vistas na figura 4. Observou-se no modelo 0 a interação de 22 aminoácidos da proteína alvo com 15 do ligante, resultando num total de 4 pontes salinas, 6 ligações de hidrogênio e 124 contatos não ligados. Já no modelo 1 ocorreu a interação entre 21 resíduos de aminoácidos da proteína alvo com 14 aminoácidos do ligante, o que proporcionou 2 pontes salinas, 8 ligações de hidrogênio e 113 contatos não ligados.

4 TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da melitina

Propriedades físico-químicas	Melitina
Número de resíduos	27
Peso molecular	2904.5 g/mol
Ponto isoelétrico	pH 12.18
Carga em pH 7	5
Solubilidade em água	Baixa solubilidade
Coefficiente de extinção	5690 M-1cm-1

Legenda: Características físico-químicas obtidas no software Pep-cal.

Tabela 2: ADMETOX da melitina e controles

	Melitina	FSH	Ionicina	Valores de referência
Permeabilidade Caco2 (cm/s)	-2.908	0.934	-3.951	> 0.90 cm/s
Absorção intestinal em humanos (%)	0	0	46.634	> 30%
Permeabilidade cutânea (kp)	-2.735 kp	-2.735 kp	-2.735	< -2.5 kp
Substrato em glicoproteína-P	Sim	Sim	Sim	-
Inibidor de glicoproteína-P I	Não	Não	Não	-
Inibidor de glicoproteína-P II	Não	Não	Sim	-
Permeabilidade BBB (log BB)	-11.801	-1.154	-1.877	> 0.3
Permeabilidade CNS (log PS)	-12.832	-5.243	-3.263	> -2
Substrato CYP2D6	Não	Não	Não	-
Substrato CYP3A4	Sim	Não	Sim	-
Inibidor CYP1A2	Não	Não	Não	-
Toxicidade Aguda Oral em Ratos (LD50) (mol/kg)	2.482	2.516	2.232	-
Toxicidade Crônica Oral em Ratos (LOAEL) (mg/kg_bw/dia)	13.049	3.987	1.886	-
Hepatotoxicidade	Sim	Sim	Sim	-
Sensibilidade cutânea	Não	Não	Não	-
Toxicidade em <i>T.Pyriformis</i> (ug/L)	0.285	0.285	0.285	> -0.5
Toxicidade em <i>Fathead minnow</i> (mM)	41.673	11.371	-0.697	< -0.3

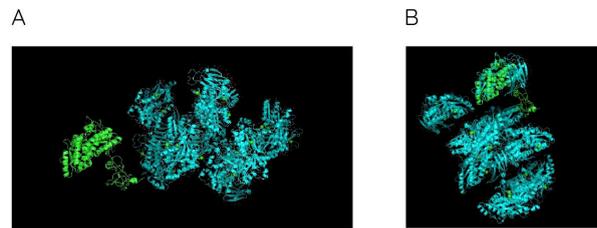
Legenda: ADME/tox diz respeito a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade.

Tabela 3: Toxicidade/ecotoxicidade da Melitina e controles

	Melitina	FSH	Ionicina
Biblioteca de toxicidade de desenvolvimento/reprodutiva	Não tóxico	Não Tóxico	Não Tóxico
Efeito mediado pelo receptor de estrogênio	Não-ativo	Não-ativo	Não-ativo
Modo de afinidade de ligação relativa ao receptor de estrogênio	Inativo	Ativo	Inativo
Efeito mediado pelo receptor de andrógeno	Não-ativo	Não-ativo	Não-ativo
Classificação de Cramer	Alto (Classe III)	Alto (Classe III)	Alto (Classe III)
Modelo de toxicidade aguda de <i>Daphnia Magna</i> (EC50)[mg/l]	0.2182	1.97	0.003
Modelo de toxicidade aguda de algas (EC50)[mg/l]	152.69	16.96	4.61
Modelo de toxicidade crônica de <i>Daphnia Magna</i> (NOEC)[mg/l]	4.93	1.44	12.44
Modelo de toxicidade crônica de algas (NOEC) [mg/l]	7.57	2.23	2.05
Toxicidade em minhocas (mg/kg)	234.12	4.696	11.848
Modo de biodegradabilidade pronto	Não facilmente biodegradável	Não facilmente biodegradável	Não facilmente biodegradável

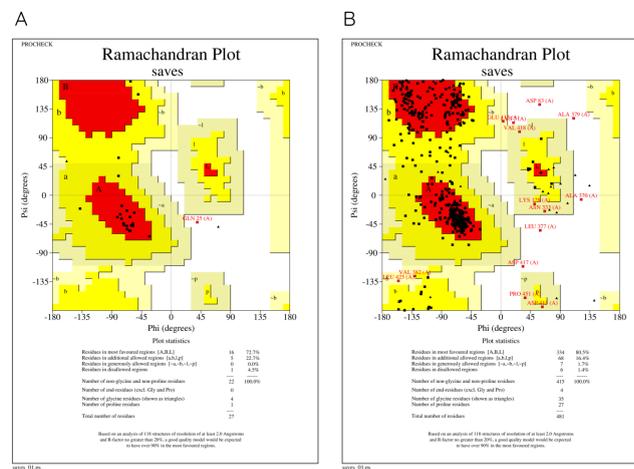
Legenda: A tabela 3 reúne dados obtidos do software Vega-Hub (1.2.3) considerando valores de toxicidade/ecotoxicidade em modelos animais e efeitos em receptores reprodutivos e estrógenos/andrógenos.

Figura 1 – Estrutura da proteína 3D4G



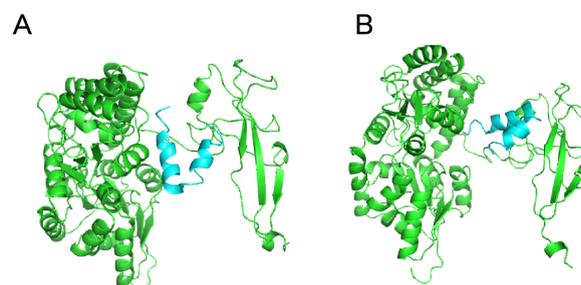
Legenda: Em verde observamos a 3D4G modelada por I-tasser e em azul a extraída da plataforma PDB. Em A observamos um comparativo estrutural e em B o alinhamento realizado pelo software Pymol.

Figura 2 – Comparativos plotagem Ramachandran



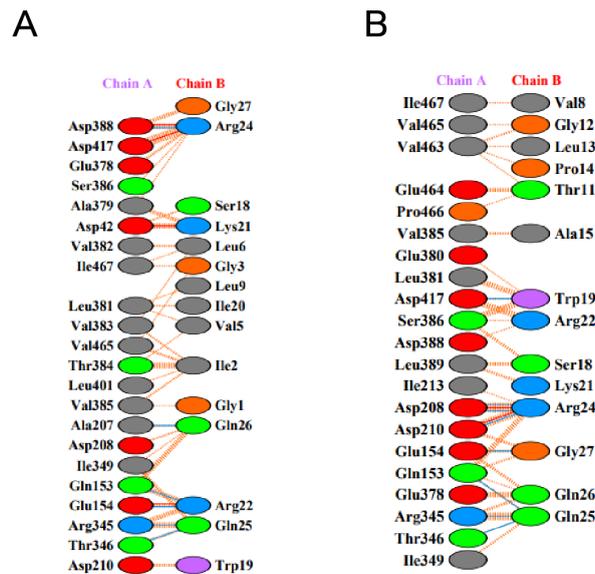
Legenda: Em A observamos a análise de Ramachandran da melitina e em B a análise da proteína 3D4G.

Figura 3 – Docking realizado no ClusPro 2.0



Legenda: Em A observamos o modelo 0 da docagem. Em B observamos o modelo 1 da docagem.

Figura 4 – Ligação de aminoácidos entre proteína alvo e o peptídeo



Legenda: Chain A são os aminoácidos da proteína alvo, enquanto chain B trata-se dos aminoácidos do ligante. Na figura A temos o modelo 0 e em B o modelo 1 da docagem.

5 DISCUSSÃO

A FIV pode ser emocionalmente desafiadora para as mulheres devido às dificuldades e tensões associadas aos fracassos do procedimento, gerando sentimentos de tristeza e medo de novos insucessos. Além disso, a dor física das injeções durante a etapa do desenvolvimento folicular também contribui para o desgaste emocional (MAKUCH; FILETTO, 2010). Diante disso, pode-se inferir que estudos que buscam avaliar efeitos de substâncias, moléculas e peptídeos em células germinativas buscando de alguma forma contribuir com as pesquisas reprodutivas que visam melhorar suas taxas de sucesso se fazem relevantes.

De acordo com (RADY, I. et al., 2017) a melitina é um composto peptídico que solubiliza-se em água, apresentando um peso molecular de 2840 g/mol, o que possui semelhança com os resultados obtidos dos modelos utilizados que sugerem pouca solubilidade em água e um peso de 2904.5 g/mol. O ponto isoelétrico (pI ou IEP) representa um parâmetro físico-químico significativo em uma variedade de substâncias, como peptídeos e proteínas, sendo útil na estimativa da carga superficial dessas moléculas em diferentes faixas de pH (Kozłowski, 2021). MAITIP et al., (2021) obteve em seus ensaios valores de ponto isoelétrico de 11,10 a 12,02, valores aproximados dos 12.18 que foram obtidos neste estudo. Em relação a carga em pH 7, (MIHAJLOVIC; LAZARIDIS, 2012) também obteve valores iguais de 5.

A possibilidade da melitina ser um ligante de cálcio conforme as demonstrações do i-tasser permitiram inferir possibilidades da mesma poder desempenhar funções semelhantes ao controle utilizado, ionomicina que de acordo com (VASILEV et al., 2012) é um agente ionóforo capaz de aumentar o cálcio intracelular podendo propiciando em oócitos a ativação oocitária. Observar interações com cálcio é interessante uma vez que, de acordo com (WHITAKER, 2006) ao adentrar no oócito, o espermatozoide desencadeia ondas de cálcio, que em mamíferos percorrem toda a extensão do óvulo, que é algo característico da interação desses gametas em diferentes espécies.

Conforme a tabela 2 buscando avaliar os parâmetros de ADME/tox primeiramente avaliou-se absorção. Com interesse de imitar as células intestinais, utiliza-se em pesquisa a linhagem caco2 de adenocarcinoma do cólon que possuem características e funcionalidades semelhantes a enterócitos (FERRARETTO et al., 2018) servindo como modelos para avaliação de absorção onde nos modelos utilizados observou-se valores de -2.908 dados que condizem com o resultado de 0% de absorção intestinal também demonstrados pelo modelo. Avaliou-se a permeabilidade cutânea, uma via transdérmica é um meio com muitas vantagens a outros métodos de administração de fármacos (PRAUSNITZ; LANGER, 2008) e nesse parâmetro a melitina apresentou valores idênticos aos controles de -2.735 kp indicando baixa permeabilidade, o que condiz com o resultados que indicaram ausência de sensibilidade cutânea. Seguindo as avaliações de absorção, obteve-se que a melitina é substrato da glicoproteína-P e não se demonstrou inibidora desta, que de acordo com (ELMELIEGY et al., 2020) é também chamada de proteína 1 de resistência a múltiplas drogas (MDR1) que desempenha um papel crucial no transporte de efluxo em células por estar envolvida na absorção de diferentes compostos por diversas células.

A Barreira Hematoencefálica (BHE) é essencial para preservar o ambiente cerebral, impedindo a entrada de solutos prejudiciais no microambiente do cérebro e atua na manutenção da região extracelular do ambiente do SNC (CHOWDHURY et al., 2021) Em relação à distribuição, os resultados indicaram uma baixa permeabilidade na barreira hematoencefálica e inaptidão de penetração no sistema nervoso central, de todos os testados, principalmente da melitina que obteve valores maiores que ambos os controles.

O cytochrome P450 (CYPs) diz respeito às principais enzimas do metabolismo de medicamentos humanos, desempenham um papel crucial na saúde geral, representando cerca

de 75% do processamento de medicamentos. Com pelo menos 57 CYPs codificados no genoma humano, essas enzimas são fundamentais para o metabolismo de produtos farmacêuticos, destacando sua importância na manutenção da saúde humana (ZHAO, M. et al., 2021). Nas análises obtidas identificou-se, que nem a melitina e os controles são substratos da isoforma CYP2D6, ou inibidoras de CYP1A2, contudo a melitina e ionicina são substratos de CYP3A4.

A escala de Cramer é amplamente utilizada na classificação e classificação de substâncias com base na toxicidade oral esperada, para substâncias de alta classe III, cujas estruturas químicas não indicam segurança inicial ou podem sugerir toxicidade significativa, ou possuem grupos funcionais reativos (LAPENNA; WORTH, 2011) Nas análises obtivemos que todos os testados são classe III. O ensaio de hepatotoxicidade indicou que a melitina pode ser prejudicial ao fígado, porém na literatura existem estudos que indicam seu potencial como agente redutor de insuficiência hepática induzida por medicamentos como o ensaios feitos por NAJI et al., (2021).

Conforme um número crescente de produtos químicos antropogênicos é liberado no meio ambiente, ameaçando a funcionalidade dos ecossistemas, a relevância do campo científico da ecotoxicologia segue aumentando (WERNER, 2018). Está que se trata de uma área que verifica em nível populacional como produtos químicos podem afetar organismos (DUPERRON et al., 2020). Os ensaios de ecotoxicidade indicaram uma quantidade maior de melitina que os controles tanto para efeitos agudos e crônicos em ratos, algas e minhocas. Além disso, não foi identificada toxicidade em peixes *Fathead minnow* mesmo com os modelos indicando que a melitina não seja facilmente biodegradável (KWON et al., 2015) verificou *in vivo* a toxicidade de um composto de veneno de abelha rico em melitina em ratos Sprague-Dawley e com doses de 1 mL e não observou mortes. Diante dessas informações, podemos inferir que possivelmente a mesma ofereça menos impactos ambientais que os controles utilizados.

O gráfico Ramachandran destaca-se como uma das teorias mais robustas na investigação da estrutura das proteínas por possuir divergência baixa entre simulações e experimentos, sendo fundamentado na estabilidade da ligação peptídica N-C, o conceito concentra-se nos ângulos de torção ϕ e Ψ e sua interpretação trazendo reflexões sobre a estrutura das proteínas (TAM; SINHA; WANG, S. M., 2020). Na plotagem de ramachandran, uma vez que valores

desejáveis fossem acima de 90% de regiões favoravelmente flexíveis, obteve-se resultados um da melitina de 95,45% e a proteína 3D4G, de 96,9% em ensaios futuros o impacto desses fatores na docagem podera ser melhor avaliado.

Os resultados do docking indicaram sobreposições dos aminoácidos em ambas as plataformas utilizadas. No ClusPro, o servidor realiza bilhões de conformações para determinar a interação rígida entre as partes do sistema, agrupamento com base no desvio quadrático médio (RMSD), que agrupa as 1000 estruturas de energia mais baixas com base na similaridade de suas conformações, encontrando aquelas que representam os modelos mais prováveis do complexo e refinamento das estruturas selecionadas por minimização de energia, onde obtêm-se os modelos mais precisos e realistas do sistema em estudo (KOZAKOV et al., 2017).

Com a visualização das ligações entre resíduos de aminoácidos foi visto a presença de pontes salinas e de ligações de hidrogênio. Esse tipo de ligação e de ponte desempenham um papel central na ligação às proteínas, especialmente na determinação da especificidade dessas ligações (XU; TSAI; NUSSINOV, 1997). As ligações de hidrogênio combinadas com interação não covalente juntamente com uma atração eletrostática entre grupos químicos ou átomos com carga oposta se tratam das pontes salinas e são encontradas em interações de resíduos Lys ou Arg e Asp ou Glu sendo participantes em proteínas em suas interações, dobramento, reconhecimento, rigidez conformacional e na estabilidade (SPASSOV; ATANASOVA; DOYTCHINOVA, 2023). Nas análises foram identificadas pontes salinas em ambos os modelos de docking entre aminoácidos citados na literatura o que nos permite inferir uma possível estabilidade entre as proteínas e o ligante.

6 CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos através dos ensaios *in silico* podemos considerar que a melitina pode possuir um potencial de ligação com a proteína de zona pelúcida 3D4G, imaginamos que essa ligação pode promover liberação de cálcio mas para confirmar isso necessita-se de realização de ensaios de dinâmica molecular para verificação da força de ligação além de ensaios *in vitro* para análise de como esse peptídeo e a proteína interagem entre si e quais os resultados de tais interações com um contato físico real.

ABREVIACÕES

ADME/tox	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
GPZ/ZPs	Glicoproteínas de zona pelúcida
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
TRA's	Técnicas de reprodução assistida
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
φ	Ângulo de torção phi
Ψ	Ângulo de torção psi
NOEC	Nível sem Efeito Observado
EC50	Concentração Efetiva de Meio

REFERÊNCIAS

AJMAT, M.T.; BONILLA, F.; HERMOSILLA, P.C.; ZELARAYÁN, L.; BÜHLER, M.I. Role of phospholipase A2 pathway in regulating activation of *Bufo arenarum* oocytes. **Zygote**. Cambridge University Press, 02 fev. 2012. DOI: 10.1017/ S0967199411000645. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/abs/role-of-phospholipase-a2-pathway-in-regulating-activation-of-bufo-arenarum-oocytes/CA1901A85147A8835AD6FEE4407FBBD8>. Acesso em: 15 nov. 2023.

ALEJANDRO, M. et al. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**. Aspiração folicular, maturação *in vitro* e injeção intracitoplasmática em éguas Follicular aspiration, *in vitro* maturation and intracytoplasmic injection in mares. v. 10, n. 3, mar. 2016. DOI: 10.22256/pubvet.v10n3.248-256 Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/1492>. Acesso em: 23 nov. 2023.

AL-SAMIE, M. A.; ALI, M. Studies on Bee Venom and Its Medical Uses. **International Journal of Advancements in Research & Technology**. Cairo, Egito v. 1, n. 2, jul. 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/258650193>. Acesso em: 23 nov. 2023.

BERTAN, Claudia Maria; CUNHA, Pauline Martins da; OLIVEIRA, Claudio Alvarenga de; TRALDI, Anneliese de Souza; BINELLI, Mario. Controle da síntese de prostaglandina F2 ALFA no endométrio bovino *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 3, 2006. Disponível em: [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/brazilian-journal-veterinary-research-and-animal-s/43-\(2006\)-3/controla-da-sintese-de-prostaglandina-f2-alfa-no-endometrio-bovino-in-](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/brazilian-journal-veterinary-research-and-animal-s/43-(2006)-3/controla-da-sintese-de-prostaglandina-f2-alfa-no-endometrio-bovino-in-). Acesso em: 16 abr. 2024.

CHOWDHURY, E. A. et al. Understanding the brain uptake and permeability of small molecules through the BBB: A technical overview. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 41, n. 8, jan. 2021. DOI: 10.1177/0271678X20985946. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8327119/>. Acesso em: 16 abr. 2024.

DUPERRON, Sébastien; HALARY, Sébastien; GALLET, Alison; MARIE, Benjamin. Microbiome-Aware Ecotoxicology of Organisms: Relevance, Pitfalls, and Challenges. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 8, 2020. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00407. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32974256/>.

ELMELIEGY, Mohamed et al. Effect of P-glycoprotein (P-gp) Inducers on Exposure of P-gp Substrates: Review of Clinical Drug–Drug Interaction Studies. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 59, p. 699–714, fev. 2020. DOI: 10.1007/s40262-020-00867-1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40262-020-00867-1>. Acesso em: 14 jul. 2024.

FERRARETTO, Anita et al. Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an in vitro model of human intestinal epithelium. **Biosci Reports**, v. 38, n. 2, abr. 2018. DOI: 10.1042/BSR20171497. Disponível em: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/38/2/BSR20171497/57179/Morphofunctional-properties-of-a-differentiated>. Acesso em: 16 abr. 2024.

KOZAKOV, D. et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 255–278, 1 fev. 2017. DOI: 10.1038/nprot.2016.169. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.169>. Acesso em: 18 abr. 2024.

KUSHNIR, V. A.; SMITH, G. D.; ADASHI, E. Y. The Future of IVF: The New Normal in Human Reproduction. **Reproductive Sciences**, v. 29, p. 849–856, 1 mar. 2022. v. 29, n. 3, p. 849–856. DOI: 10.1007/s43032-021-00829-3. Disponível em: <https://rdcu.be/dNS6Z>. Acesso em: 14 nov. 2023.

LAPENNA, S.; WORTH, A. Analysis of the Cramer classification scheme for oral systemic toxicity-implications for its implementation in Toxtree. **Publications Office of the European Union**, 2011. DOI: 10.2788/39716. Disponível em: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC66022>. Acesso em 14 abr 2024.

LEE K. H.; YU J.; SUN S.; KWON K. Intravenous Single Dose Toxicity of Sweet Bee Venom in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 18, n. 3, p. 49–56. set. 2015. DOI: 10.3831/KPI.2015.18.024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26389001/>. Acesso em 18 abr. 2024.

MAITIP, J. et al. Comparative study of antimicrobial properties of bee venom extracts and melittins of honey bees. **Antibiotics**, 1 dez. 2021. v. 10, n. 12. DOI: 10.3390/antibiotics10121503. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/12/1503>. Acesso em: 16 nov. 2023.

MARTE MYHRE, R.; RITSA, S. Development of In Vitro Fertilization, a Very Important Part of Human Reproductive Medicine, in the Last 40 Years. **International Journal of Women's Health and Wellness**, 30 jun. 2019. v. 5, n. 1. DOI: 10.23937/2474-1353/1510089. Disponível em: <https://www.clinmedjournals.org/articles/ijwhw/international-journal-of-womens-health-and-wellness-ijwhw-5-089.php?jid=ijwhw>. Acesso em: 14 nov. 2023.

MIHAJLOVIC, M.; LAZARIDIS, T. Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1818, n. 5, p. 1274–1283, maio. 2012. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.01.016. Disponível

em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527361200020X?via%3Dihub>. Acesso em: 17 abr. 2024.

MAKUCH, María Yolanda; FILETTO, Juliana Nicolau. Procedimentos de fertilização in vitro: experiência de mulheres e homens. **Psicologia em Estudo**. Dez. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pe/a/vmczbv8kjXQCYy7n4SymVzs#>. Acesso em: 16 abr. 2024.

NAJI, K. M. et al. Hepatoprotective activity of melittin on isoniazid- and rifampicin-induced liver injuries in male albino rats. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 22, n. 1. dez. 2021. DOI: 10.1186/s40360-021-00507-9. Disponível em: <https://bmcparmacoltoxicol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40360-021-00507-9>. Acesso em: 15 abr. 2024.

NIXON, B.; AITKEN, R. J.; MCLAUGHLIN, E. A. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 64, p. 1805–1823, 2007. DOI: 10.1007/s00018-007-6552-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-007-6552-x>. Acesso em: 15 nov. 2023.

WASSARMAN, Paul M. Zona pellucida glycoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24285-24289, set. 2008. DOI: 10.1074/jbc.R800027200. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)49170-9/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)49170-9/fulltext). Acesso em: 15 nov. 2023.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, 07 nov. 2008. DOI: 10.1038/nbt.1504. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.1504>. Acesso em: 17 abr. 2024

RADY, Islam et al. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 402, p. 16-31, 28 ago. 2017. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.05.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383517303324?via%3Dihub>. Acesso em: 14 nov. 2023.

SFORSIN, J. M. et al. **Apiterapia: medicamentos das abelhas e possíveis tratamentos**. São Paulo: Editora UNESP, 2022. DOI: 10.7476/9786557142974. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/jq5dd>. Acesso em: 12 nov. 2023.

SILVA, Scheila de Avila e; NOTARI, Daniel Luis; DALL'ALBA, Gabriel (orgs.). **Bioinformática [recurso eletrônico]: contexto computacional e aplicações**. Caxias do Sul, RS: Educs, 2020. Disponível em: <https://www.uces.br/educs/livro/bioinformatica-contexto-computacional-e-aplicacoes/>. Acesso em: 14 nov. 2023.

SPASSOV, D. S.; ATANASOVA, M.; DOYTCHINOVA, I. A role of salt bridges in mediating drug potency: A lesson from the N-myristoyltransferase inhibitors. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, 2022. DOI: 10.3389/fmolb.2022.1066029. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2022.1066029/full>. Acesso em: 16 abr. 2024.

STEWART, L. M. et al. How effective is in vitro fertilization, and how can it be improved?. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 5, p. 1677–1683, abr. 2011. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.01.130. Disponível em: <http://www.fertstert.org/article/S0015028211001646/fulltext>. Acesso em: 23 nov. 2023.

TAM, B.; SINHA, S.; WANG, S. M. Combining Ramachandran plot and molecular dynamics simulation for structural-based variant classification: Using TP53 variants as model. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 4033–4039, dez. 2020. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.11.041. Disponível em: [https://www.csbj.org/article/S2001-0370\(20\)30508-0/fulltext](https://www.csbj.org/article/S2001-0370(20)30508-0/fulltext). Acesso em: 17 abr. 2024.

VASILEV, F. et al. Effects of ionomycin on egg activation and early development in starfish. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 18 jun. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0039231. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0039231>. Acesso em: 15 abr. 2024.

WEADICK, Cameron J. Molecular Evolutionary Analysis of Nematode *Zona Pellucida* (ZP) Modules Reveals Disulfide-Bond Reshuffling and Standalone ZP-C. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1240-1255, ago. 2020. DOI: 10.1093/gbe/evaa095. Disponível em: <https://academic.oup.com/gbe/article/12/8/1240/5840476?login=false>. Acesso em: 14 nov. 2023.

WERNER, Inge. The Swiss Ecotox Centre: bridging the gap between research and application. **Environmental Sciences Europe**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 1-10, 16 maio 2018. DOI: 10.1186/s12302-018-0147-z. Disponível em: <https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-018-0147-z>.

WHITAKER, Michael. Calcium at fertilization and in early development. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 1, p. 25-88, jan. 2006. DOI: 10.1152/physrev.00023.2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3299562/>. Acesso em: 15 abr. 2024.

XU, D.; TSAI, C. J.; NUSSINOV, R. Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 10, n. 9, p. 999 - 1012, set. 1997. DOI: 10.1093/protein/10.9.999. Disponível em: <https://academic.oup.com/peds/article/10/9/999/1497852>. Acesso em: 16 abr. 2024.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. **Human Reproduction**, 1 nov. 2009. v. 24, n. 11, p. 2683–2687. Disponível em: 10.1093/humrep/dep343. Acesso em: 14 nov. 2023.

ZHAO, Mingzhe et al. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 2021. Disponível em: 10.3390/ijms222312808. Acesso em: 16 abr. 2024.