

PERFIL ELETROFORÉTICO DO VENENO DO ESCORPIÃO *Tityus uruguayensis*

LAÍS CESCHINI MACHADO¹; EVELISE LEIS CARVALHO²; TAINAH OLIVEIRA E MIRANDA²; FILIPE ZIMMER DEZORDI²; DOUGLAS SILVA DOS SANTOS²; PAULO MARCOS PINTO³

¹Universidade Federal do Pampa – laisceschini@gmail.com

²Universidade Federal do Pampa – eveliseleis@gmail.com ; tainahverallo@hotmail.com ;
zimmer.filipe@gmail.com ; douglasbio@yahoo.com.br

³Universidade Federal do Pampa – paulomarcospinto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A ordem Scorpiones pode ser considerada diversa, apresentando mais de 1.500 espécies conhecidas, distribuídas em 14 famílias e 163 gêneros (FET et al., 2000). A família Buthidae é a mais importante pelo número de espécies, estando representada na América do Sul, incluindo o Brasil, pelo gênero *Tityus* C. L. Koch, 1836. Todos os escorpiões de importância médica existentes no Brasil pertencem a este gênero, como as espécies *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus tigmarus* (LUCAS; SILVA JUNIOR, 1992). Dentre das mais de 180 espécies do gênero *Tityus* descritas, *Tityus uruguayensis*, é uma espécie de ocorrência exclusiva do Bioma Pampa, Rio Grande do Sul, e com descrições de acidentes escorpiônicos. Devido a poucos relatos na literatura científica esta espécie se torna uma fonte de interesse acadêmico principalmente no que diz respeito à composição proteica do veneno.

Muitos estudos têm provado que a composição de venenos possui não menos do que 100 diferentes moléculas bioativas e, muitas delas, originadas a partir de modificações pós traducionais de proteínas e peptídeos (SABATIER et al, 2003). Tal riqueza pode ser útil para a biotecnologia de muitas maneiras, com a prospecção de novos fármacos ou novas entidades químicas que pode ser utilizado como compostos terapêuticos sendo os mais promissores. Também digno de nota que muitos dos *topselling* dos produtos farmacêuticos em todo o mundo são produtos naturais ou análogos sintéticos e semissintéticos de recursos naturais (MYLES,2003).

Para avaliar a composição peptídica do veneno de escorpiões e outros animais peçonhentos faz-se uso de uma importante técnica, empregada principalmente na caracterização bioquímica de proteínas e peptídeos, denominada eletroforese (MARCUSI et al., 2011).

O estudo e caracterização das frações proteicas de venenos é um campo bastante fértil, onde os desafios significativos permanecem sem solução, mas o rápido progresso tecnológico permite a descoberta da imensa gama de peptídeos do veneno farmacologicamente ativos (ESCOUBAS et al., 2008). Portanto este trabalho tem como objetivo padronizar a extração e o perfil eletroforético da fração peptídeo/proteica do veneno do escorpião *T. uruguayensis*.

2. METODOLOGIA

Escorpiões da espécie *T. uruguayensis* foram capturados nas proximidades do *campus* da Universidade Federal do Pampa, localizado no município de São Gabriel, Rio Grande do Sul, no 2º semestre de 2013.

A captura foi realizada por meio de *pitfall traps*, alocadas próximas a árvores e troncos em decomposição, visto que são o habitat da espécie.

A solução de veneno foi preparada como descrito em SALAMA e SHARSHAR (2013), utilizando método de maceração com nitrogênio líquido até os télsons serem reduzidos a um pó fino, onde posteriormente foram dissolvidos em solução salina NaCl 0,9% e mantidos a 4° C por 72 horas. A solução de veneno foi centrifugada à 10.000 x g por 10 minutos à 4° C. O sobrenadante foi removido, liofilizado e armazenado à 20° C até sua utilização.

As proteínas presentes no veneno de *T. uruguayensis* foram submetidas a precipitação por ácido tricloroacético (TCA) 20% em acetona. 20µL extrato protéico do veneno de *T. uruguayensis* foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguindo protocolo descrito por CARVALHO (2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi padronizar a extração e o perfil eletroforético da fração peptídeo/proteica do veneno do escorpião *T. uruguayensis*. Para isto, armadilhas *pitfall traps* foram utilizadas, as quais se mostraram eficazes, totalizando 12 exemplares capturados. Posteriormente, os escorpiões foram anestesiados e os télsons removidos foram utilizados para preparar a solução de veneno, como descrito na Metodologia.

A quantificação da fração peptídeo/proteica realizada de acordo com o protocolo de BRADFORD (1976) demonstrou 30ng/µL.

A fim de identificar a fração peptídeo/proteica do veneno de *T. uruguayensis*, SDS-PAGE foi realizada e o resultado é mostrado na FIGURA 1. Para melhorar a resolução do gel e remover moléculas não protéicas, a amostra do veneno foi submetida a precipitação com TCA/acetona.

Em nosso estudo, a SDS-PAGE da amostra mostrou 10 bandas, as quais variaram de 18-70kDa. Vários peptídeos neurotóxicos já foram isolados e caracterizados a partir do veneno de várias espécies de escorpião (SHWARTZ et al., 2012). O seu peso molecular varia de 4kDa, tal como no veneno do escorpião mexicano *Centroides limpidus limpidus* (MARTIN et al, 2004) a aproximadamente 45kDa em venendo de *Tityus stg murus* (BATISTA et al, 2007). Peptídeos do veneno do escorpião de peso molecular variando entre 36-46kDa, mostram alta atividade proteolítica (HALDAR et al, 2010). ROODT et al. (2010) na caracterização bioquímica por SDS-PAGE do veneno de *Tityus trivittatus*, obtido por maceração do télson, detectou bandas com peso molecular variando entre 10-35kDa, a mesma característica que pode-se notar no nosso estudo.

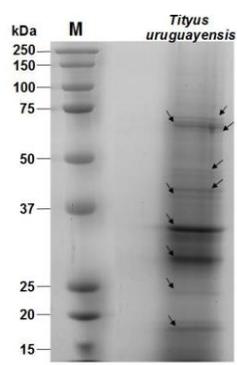


Figura 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do veneno do escorpião *T. uruguayensis*. Amostra do veneno de *Tityus uruguayensis* submetida à

SDS-PAGE na concentração de 30ng/ μ L, precipitada com TCA 20% em acetona. As setas indicam as bandas protéicas visualizadas. M - marcador molecular Precision Plus Protein TM Kaleidoscope Standards 161-0375 Bio-Rad.

Atualmente metodologias mais modernas são utilizadas para complementar as informações obtidas da técnica de eletroforese. Entre estas, inclui-se proteômica, que está relacionada com o conjunto de tecnologias que tem por objetivo separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas (ISFOR, 2002).

Com a aplicação de técnicas de proteômica na área de toxicologia, surgiu este novo ramo desta ciência, denominado venômica, que se pode caracterizar como sendo o estudo do proteoma de venenos animais. Portanto, a venômica tem utilizado abordagens baseadas em eletroforese bidimensional, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas para separar, identificar e determinar a sequência de aminoácidos de toxinas e inferir sua possível atividade biológica com auxílio de ferramentas da bioinformática.

4. CONCLUSÃO

Considerando os dados obtidos no presente estudo pode se concluir que a armadilha utilizada para coleta dos escorpiões *T. uruguayensis* mostram eficazes quanto ao seu propósito. O método de extração através de maceração dos télsons demonstrou ser eficiente, resultando em dez bandas detectadas na análise da fração peptídico/proteica por SDS-PAGE.

Os dados gerados no presente trabalho não nos permitem estimar os números de proteínas, visto que a análise ficou restrita a SDS-PAGE. Contudo etapas futuras com estudos mais aprofundados, como análise em eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

Este trabalho, pioneiro com a espécie *T. uruguayensis*, contribui para padronização da coleta e extração do veneno da espécie, bem como para uma caracterização do perfil eletroforético do veneno do escorpião *T. uruguayensis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FET, V., SISSOM, W.D., LOWE, G. & BRAUNWALDER, M. E. **Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998)**. New York Entomological Society, New York, 2000.

SABATIER, J.M., WAARD, M. **Handbook of biologically active peptides**. San Diego: 2^a ed. Elsevier, 2003.

LUCAS, S.M.; SILVA Jr., P.I. Aranhas de interesse médico no Brasil. In: SCHVARTSMANN, S. (Ed.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 189-196.

BATISTA CV, ROMÁN-GONZÁLEZ SA, SALAS-CASTILLO SP, ZAMUDIO FZ, GÓMEZ-LAGUNAS F, POSSANI LD., Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species, **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, Amsterdam, v.146, n.1-2, p.147-157, 2007

ESCOUBAS, P., QUITON, L., NICHOLSON, G.M., Venomics: unraveling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **J. Mass. Spectrom**, Valbonne v.43, n.3, p. 279–295, 2008.

HALDAR S, DAS GUPTA S, GOMES A, GIRI B, DASGUPTA SC, BISWAS A, MISHRA R, GOMES A. A high molecular weight protein Bengalin from the Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* C.L. Koch) venom having antiosteoporosis activity in female albino rats. **Toxicon**. Amsterdam, v.55, n.2-3, p.455-461, 2010.

ISFOR, R. J. Proteomics analysis of striated muscle. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sci.** Amsterdam, v. 771, n. 1-2, p.155-165, 2002.

MARCUSSI S, SANTOS P.R, MENALDO D.L, SILVEIRA L.B, SANTOS-FILHO N.A, MAZZI M.V, DA SILVA S.L, STÁBELI R.G, ANTUNES L.M, SOARES A.M. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.724, n.1-2, p.59-63.

MARTIN BM, RAMIREZ AN, GURROLA GB, NOBILE M, PRESTIPINO G, POSSANI LD. Novel K(+)-channel-blocking toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. **Biochem J.** v.304, p. 51-56, 1994.

MYLES, D.C. Novel biologically active natural and unnatural products. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v.14, n.6, p. 627-633, 2003.

ROODT A. R. , CORONAS F. I.V., LAGO N. , GONZÁLEZ M. E., LASKOWICZ R. D., BELTRAMINO J. C. , SAAVEDRA S. , LÓPEZ R. A., REATI G. J. , VUCH M. G., BAZÁN E., VARNI L., SALOMÓN O.D. AND POSSAN L. D. General biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivittatus* of Argentina. **Toxicon**, Amsterdam, v.55, n.6 , p.307–319, 2010

SALAMA W.M, SHARSHAR K.M. Surveillance study on scorpion species in Egypt and comparison of their crude venom protein profiles. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, Amsterdam, v.66, p.76-86, 2013.

SCHWARTZ E.F, MOURÃO C.B, MOREIRA K.G, CAMARGOS T.S, MORTARI M.R. Arthropod venoms: a vast arsenal of insecticidal neuropeptides. **Biopolymers**, v.98, n.4, p.385-405, 2012.

CARVALHO, E.L. **Caracterização da fração proteica do veneno do escorpião *Bothriurus bonariensis***, 2013. Monografia (Trabalho de conclusão de curso), Graduação em Biotecnologia - Universidade Federal do Pampa.