

Captura do escorpião *Bothriurus bonariensis* e determinação da fração proteica de seu veneno

Douglas Silva dos Santos^{1,2}, Evelise Leis Carvalho¹, Paola Bolzan Machado¹, Jeferson Camargo de Lima¹, Juliano Tomazzoni Boldo^{1,2}, Chariston André Dal Belo^{1,2}, Paulo Marcos Pinto^{1,2}

¹Universidade Federal do Pampa – Laboratório de Proteômica Aplicada
Av. Antônio Trilha, 1847- São Gabriel - RS- CEP: 97300-000 - E-mail: (douglasbio@yahoo.com.br)
²Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pampa, Departamento de Pós-graduação- São Gabriel- RS- CEP: 97300-000

RESUMO

Escorpiões são artrópodes pertencentes à classe Arachnida e ordem Scorpiones. O gênero Bothriurus é a mais especiosa da família Bothriuridae, com 41 espécies descritas e 10 espécies registradas no Brasil. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a fração proteica do veneno do escorpião Bothriurus bonariensis em busca de componentes bioativos com interesse biológico e biotecnológico. Os escorpiões foram capturados por meio de armadilhas em São Gabriel, RS, Brasil. A extração de veneno foi realizada por estimulação elétrica de 35 V, diretamente do último segmento abdominal. Um extrato da amostra do veneno foi submetido à precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 20% diluído em acetona. A análise SDS-PAGE foi realizada com amostras contendo 30 e 60 µg de proteínas. As amostras que não foram precipitadas com TCA, não mostraram bandas proteicas. Por outro lado, as amostras previamente tratadas com TCA mostraram sete bandas (de 25 KDa a 250 KDa) na análise SDS-PAGE.

Palavras-chave: *Bothriurus bonariensis*, proteômica, SDS-PAGE, proteínas do veneno.

INTRODUÇÃO

A ordem Scorpiones pode ser considerada bastante diversa, apresentando mais de 1.500 espécies conhecidas, distribuídas em 14 famílias e 163 gêneros¹. No Brasil, a escorpiofauna é representada por quatro famílias, Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Ischnuridae, abrangendo 17 gêneros e 94 espécies consideradas atualmente válidas².

A família Bothriuridae é predominante neotropical, possuindo representantes na África, Índia, Austrália e regiões temperadas e subtropicais da América do Sul³. Inclui aproximadamente 140 espécies e 15 gêneros⁴. São escorpiões de pequeno a médio porte (2,5 a 6 cm), com coloração variando do avermelhado ao preto. O gênero *Bothriurus* é o mais especioso desta família, com 41 espécies sendo 10 espécies registradas para o Brasil⁴.

Todos os escorpiões de importância médica existentes no Brasil pertencem ao gênero *Tityus*, representando 60% da fauna escorpiônica neotropical⁵. Porém, espécies de outras famílias também têm causado acidentes de menor gravidade, como algumas espécies das famílias Bothriuridae e Chactidae⁴. Segundo dados do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande

do Sul (CIT-RS), no ano de 2011, o número de acidentes escorpiônicos foi de 402, sendo que 238 foram causados pelo escorpião *B. bonariensis*⁶.

O sucesso adaptativo dos escorpiões deve-se, em parte, à habilidade de produzir e inocular uma peçonha eficiente⁷. A função dessa peçonha, de paralisar as presas e causar injúria aos agressores, é exercida por uma complexa mistura de componentes bioativos, que são capazes de induzir respostas fisiológicas e farmacológicas em insetos e/ou mamíferos^{8, 9}. A peçonha do escorpião pode ser obtida por maceração da glândula ou estimulação elétrica do télson do animal.

Devido ao seu elevado grau de especificidade alvo, as toxinas de veneno foram cada vez mais utilizadas como ferramentas farmacológicas e, como protótipos para o desenvolvimento de drogas¹⁰. 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 eletroforese¹¹.

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) permite a visualização das proteínas presentes na peçonha do escorpião, possibilitando estimar a massa de cada proteína, por comparação com massas moleculares conhecidas¹¹. O termo proteoma foi introduzido há alguns anos e descrito como todas as proteínas expressas em um genoma ou tecido¹². Recentemente, abordagens proteômicas têm sido empregadas na avaliação do veneno de escorpiões¹³. A evolução desta abordagem experimental tem como resultado o desenvolvimento, a integração e a automatização de uma variedade de técnicas e equipamentos que permitem separar, identificar, quantificar e caracterizar proteínas, bem como relacionar essa informação com a obtida por outras abordagens, através da bioinformática¹⁷.

O *B. bonariensis* é um aracnídeo pouco estudado e de certa forma negligenciado, pois esta espécie não apresenta quadros de acidentes escorpiônicos graves do ponto de vista de interesse médico. Por ser comum e abundante na região do bioma pampa, o mesmo se torna fonte de interesse, principalmente no que diz respeito à composição do veneno, devido ao potencial biotecnológico dos pequenos peptídeos que o compõe. Desse modo, este trabalho tem por objetivo principal a caracterização da fração proteica do veneno em busca de melhor suprir a falta de dados sob a peçonha dessa espécie, bem como contribuir para estudos futuros mais aprofundados sobre esse veneno.

MATERIAL E MÉTODOS

Escorpiões da espécie *B. bonariensis* foram capturados nas proximidades do *campus* da Universidade Federal do Pampa (área 1) e no Cerro do Batovi (área 2), ambos localizados no município de São Gabriel, Rio Grande do Sul, no período entre dezembro de 2012 à março de 2013. A captura foi realizada por meio de armadilhas, que consistem em cortes médios de papelão com dimensões de 40 cm de largura x 40 cm de comprimento distribuídas na área 1. As armadilhas de intercepção e queda, que consistem em recipientes enterrados até sua superfície superior ficar nivelada com o solo, estas foram inseridas na área 2.

Treze exemplares coletados escolhidos aleatoriamente foram mantidos em cativeiro, na tentativa de mimetizar o habitat da espécie. Este ambiente consistiu em um aquário de vidro, forrado areia e pedras, pedaços pequenos de madeira, cascas e folhas de árvores, também foram depositados.

A extração do veneno do escorpião *B. bonariensis* foi realizada através da estimulação elétrica por corrente contínua de 35V, diretamente no derradeiro segmento abdominal. O *pool* dos venenos coletados foi diluído em 100µl de solução salina 0,9% e armazenado à -20° C até o momento do uso. As proteínas presentes no *pool* do veneno de *B. bonariensis* foram submetidas a precipitação por ácido tricloroacético (TCA) 20% em acetona por 24h à -20° C, posteriormente, centrifugadas e então o *pellet* foi utilizado.

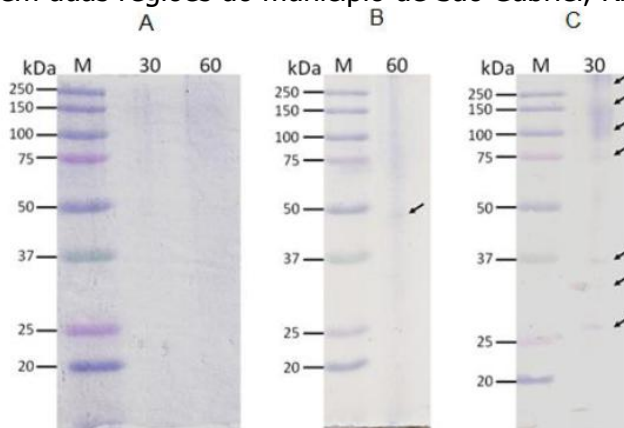
A fração proteica do veneno de *B. bonariensis*, foi quantificada de acordo com o protocolo de Bradford (1976). A análise de SDS-PAGE 12% foi realizada utilizando amostras contendo 30 µg e 60 µg de proteínas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As armadilhas utilizadas para a captura dos escorpiões *B. bonariensis* se mostraram eficazes. Com armadilha de intercepção e queda obteve-se 149 exemplares, enquanto na armadilha de cortes de papelão, o número de indivíduos capturados foi de 15, totalizando 164 exemplares de *B. bonariensis* capturados. A extração do veneno foi realizada por eletroestimulação nos 164 exemplares, coletados com os dois tipos de armadilhas utilizadas neste estudo. Foram realizadas duas extrações de veneno, a primeira com os 15 escorpiões coletados na área 1. Destes, foram obtidos cerca de 50 µL de veneno com 3,34 µg de proteína/µL (amostra A). A segunda extração foi efetuada com os 149 animais coletados na área 2. A quantidade de veneno obtida foi cerca de 250 µL com 2,25 µg de proteína/µL (amostra B). Uma alíquota da amostra B foi utilizada para precipitação das proteínas com TCA 20% (amostra C).

A amostra A, quando submetida à SDS-PAGE, nas concentrações de 30 µg e 60 µg de proteínas não apresentou nenhuma banda. Na amostra B, concentração de 60 µg de proteínas, observou-se uma banda estimada em 50 kDa. A amostra C, a qual foi submetida à precipitação com TCA, apresentou sete bandas de proteínas com valores estimados de 250 kDa a 25 kDa. Estes resultados indicam que o veneno do escorpião *B. bonariensis*, além da fração proteica, é composto por uma gama de outras substâncias os quais interferem na resolução da eletroforese. Assim a precipitação das proteínas presente no veneno com TCA, se torna indispensável para obter um gel com boa resolução para a caracterização das proteínas.

Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) do veneno do escorpião *B. bonariensis* capturados em duas regiões do município de São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil.



CONCLUSÕES

Considerando os dados obtidos no presente estudo pode concluir-se que as armadilhas utilizadas para coleta dos escorpiões *B. bonariensis* se mostram eficazes quanto ao seu propósito. A armadilha da interceptação e queda obteve um maior número de exemplares, quando comparada a armadilha de cortes de papelão.

Na análise da fração proteica por SDS-PAGE foram detectadas sete bandas proteicas e a precipitação das proteínas por TCA se mostra essencial para um gel com resolução de boa qualidade.

Este trabalho, pioneiro com a espécie *B. bonariensis*, contribui para padronização da sua coleta de veneno, bem como para uma determinação da fração proteica do veneno do escorpião *B. bonariensis*.

REFERÊNCIAS

- (1) SOLEGLAD, M. E.; FET, V. High level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni). **Escorpius**, 11, p. 1-175, 2003.
- (2) LOURENÇO, W.R. Scorpion of Brazil. Paris: **Les Edictions de l'If**, p. 307, 2002.
- (3) SCHMIDT, G.O. Levantamento dos escorpiões na restinga da Praia da Pinheira, Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- (4) BRAZIL, T.K.; PORTO, T.J. Os escorpiões. Salvador: **Editora da Universidade Federal da Bahia**, 2010.
- (5) LUCAS S.M., JUNIOR S.P.I. Plantas venenosas e animais peçonhentos. São Paulo: **Sarvier**, 1992.
- (6) NICOLELLA, A.; MITIDIERI, E.F.; LESSA, C.A.S. Relatório anual 2011, Dados de atendimento. Disponível em: <http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/2011_ver02.pdf>. Acesso em: 4 de abril de 2013.
- (7) INCEOGLU, B.; LANGO, J.; JING, J.; CHEN, L.; DOYMAZ, F.; PESSAH, I.N.; HAMMOCK, B.D. One scorpion, two venoms: Prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. **PNAS**, 100, p. 922-927, 2003.
- (8) LORET, E.; SAMPIERI, F.; MIRANDA, F.; GRANIER, C.; ROCHAT, H. Scorpion toxins active on insects. **Methods in Neuroscience**, 8, p. 381-395, 1992.
- (9) EITAN, M.; FOWLER, E.; HERRMANN R.; DURVAL, A.; PELHATE, M.; ZLOTKIN, E. A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action. **Biochemistry**, 29, p. 5941-5947, 1990.
- (10) CALVETE, J.J. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **Journal of Proteomics**, 72, p. 121-126, 2009.
- (11) MARCUSSI, S.M.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação e suas toxinas. Ribeirão Preto: **FUNPEC Editora**, 2011.
- (12) WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. Proteome research: new frontiers in functional genomics. **Springer-Verlag**, p. 243, 1997.
- (13) PIMENTA, A.M.; ALMEIDA, M.F.; LIMA, M.E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; BOUGIS, P.E.; 2003. Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, 17, p. 413-418, 2003.
- (14) FOX, J.W.; SHANNON, J.D.; STEFANSSON, A.S.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; SERRANO, S.M.T.; CAMARGO, A.C.M.; SHERMAN, N. Role of discovery science in toxicology: examples in venom proteomics. **Perspectives in Molecular Toxicology**, 2002.