

INSTITUTO BUTANTAN
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA

MARIA BEATRIZ VIANA DOS SANTOS

**ESTUDO COMPARATIVO DAS PROTEÍNAS DE ALTO
PESO MOLECULAR DE VENENO DE ESCORPIÕES DE
INTERESSE MÉDICO DO BRASIL**

SÃO PAULO

2013

SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE
PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

MARIA BEATRIZ VIANA DOS SANTOS

ESTUDO COMPARATIVO DAS PROTEÍNAS DE ALTO
PESO MOLECULAR DE VENENO DE ESCORPIÕES DE
INTERESSE MÉDICO DO BRASIL

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional/SES, elaborada no Instituto Butantan / Laboratório de Farmacologia, orientada pela Dr. Norma Yamanouye.

Área: Aprimoramento Científico e Ações em Saúde na Base Avançada do Instituto Butantan na Amazônia

São Paulo

2013

SUMÁRIO

RESUMO	i
1. Introdução	1
1.1- Os escorpiões	1
1.2- Escorpionismo	5
1.3- O veneno do escorpião	7
1.4- Proteínas de alto peso molecular em veneno de escorpiões	11
2. Objetivo	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1- Tampões e soluções	15
3.2- Reagentes	16
3.3- Animais e venenos	17
3.4- Determinação das proteínas	18
3.5- Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 1-DE)	18
3.6- Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 2-DE)	19
3.6.1- Rehidratação das fitas:	19
3.6.2- Focalização Isoelétrica	19
3.6.3- Equilíbrio das fitas	19
3.6.4- Eletroforese em gel de poliacrilamida	20
3.7- Western Blotting	20
4. Resultados	22
4.1- Análise das proteínas presentes no veneno de três espécies de <i>Tityus</i> : Abordagem SDS-PAGE 1-DE	22
4.2- Análise das proteínas presentes no veneno de três espécies de <i>Tityus</i> : Abordagem SDS-PAGE 2-DE	24
5. Discussão	34
6. Conclusão	38
7. Referências Bibliográficas	39

RESUMO

Os escorpiões do gênero *Tityus* são amplamente distribuídos no Brasil, seu veneno é constituído por uma complexa mistura de toxinas: proteínas de alta massa molecular ($PM > 10$ kDa), peptídeos (PM 3-10) e componentes de baixa massa molecular ($PM < 1$ kDa). Estudos ômicos focam principalmente em neurotoxinas, peptídeos e proteínas de baixa massa molecular, que agem em canais de sódio, potássio, cloreto e cálcio. Apesar das proteínas de alta massa molecular serem pouco estudadas, já foi detectada a presença de hialuronidase (51 kDa), antarease (~25,5 kDa), heminecrolisina (~33 kDa) e enzimas com atividade gelatinolítica. Com isso, o objetivo deste trabalho foi comparar o perfil das proteínas de alta massa molecular ($PM > 14$ kDa) do veneno de três espécies de escorpiões do gênero *Tityus* : *Tityus serrulatus* (*Ts*), *Tityus bahiensis* (*Tb*) e *Tityus obscurus* (*To*). Os venenos dos escorpiões *Ts*, *Tb* e *To* foram obtidos no Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan. As proteínas dos venenos foram separadas por SDS-PAGE 1-DE e 2-DE e as densidades das bandas ou spots foram quantificados pelo programa Quantity One e Image Master Platinum, respectivamente. Os ensaios de Western blotting foram feitos para verificar se o soro antiescorpiônico é capaz de reconhecer as proteínas desses venenos. Foi possível observar diferenças entre o perfil proteico dessas três espécies. Em SDS-PAGE 1-DE foram detectadas 3 bandas comuns entre os venenos, 74, 60 e 45 kDa. Duas bandas comuns de aproximadamente 60 e 16 kDa foram detectadas entre os venenos de *Ts* e *Tb*, bandas de aproximadamente 63 e 41 kDa são exclusivas do veneno de *Ts* e bandas de aproximadamente 37, 33 e 32 kDa são exclusivas do veneno de *To*. Já em SDS-PAGE 2-DE, foram detectados 81 spots exclusivos no veneno de *Ts*, enquanto que em *To* foram detectados 73 spots e em *Tb* 81. Entre *Ts*, *Tb* e *To* foram detectado 8 spots comuns, entre *Ts* e *To* 10 spots, entre *Ts* e *Tb* 15 spots e entre *Tb* e *To* 10 spots. O soro antiescorpiônico reconheceu todas as

proteínas do veneno de *Ts*, porém não reconheceu as proteínas de 16 kDa de *Tb* e 22 kDa de *To*, além das proteínas abaixo de 14 kDa em 1-DE e abaixo de 30 kDa em 2-DE. Sendo assim, nossos dados mostram diferenças significativas nos venenos analisados e sugerem que essas proteínas de alta massa molecular podem ter um papel significativo na toxicidade dos venenos desses escorpiões. Desta forma, novos estudos podem possibilitar a compreensão da fisiopatologia do envenenamento por essas espécies.

Palavras-chave: análise proteômica, veneno, escorpião, *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*.

1. Introdução

1.1- Os escorpiões

Os escorpiões pertencem ao Filo Arthropoda, classe Arachnidae e ordem Scorpiones. Possuem uma grande variedade de habitats, podendo ocupar ambientes como desertos, florestas tropicais, altitudes elevadas, cavernas e até áreas urbanas se abrigando em casas ou próximo delas, em geral em meio a entulhos, troncos de árvores e tijolos. São animais que em geral se alimentam de insetos, tais como grilos e baratas e apresentam hábitos noturnos (Hadley, 1974; Ministério da Saúde, 2009).

No Brasil, os escorpiões são representados por 4 famílias: Bothriuridae, Chactidae, Ischnuridae e Buthidae. Esta última é representada pelas espécies de escorpiões de importância médica que causam a maioria dos acidentes graves e em alguns casos, óbitos. A Família Buthidae, com cerca de 80 gêneros e 550 espécies, possui distribuição geográfica em todos os continentes, com exceção da Antártica. O gênero *Tityus* é muito encontrado no Brasil, com cerca de 30 espécies (Cardoso *et al*, 2003) e são extensamente estudados devido aos inúmeros acidentes causados em humanos (Ismail, 1995).

Os principais escorpiões de importância médica são o *Tityus serrulatus* (Lutz e Mello, 1922), *Tityus bahiensis* (Perty, 1933), *Tityus stigmurus* (Thorell, 1877) e o *Tityus obscurus*, também conhecido como *Tityus paraensis* (Kraepelin, 1896).

O escorpião *Tityus serrulatus*, conhecido como o escorpião amarelo, possui entre 5 a 7 cm de comprimento, possui pernas e cauda amarelo-clara e tronco escuro. É assim denominado devido à presença de uma serrilha nos 3º e 4º anéis da cauda. Antes essa espécie era restrita aos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Santa Catarina,

Rio de Janeiro, Espírito Santo e parte do sul da Bahia (Museu Instituto Butantan/ Aranhas e Escorpiões, 2001), porém devido a sua boa adaptação a ambientes urbanos e sua rápida proliferação, atualmente possui sua distribuição ampliada para outras regiões do nordeste (Bahia, Ceará, Pernambuco, Sergipe, Piauí, Rio Grande do Norte), centro oeste (Mato grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal), sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo) e sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (Borges *et al*, 2010) (Figura 1).

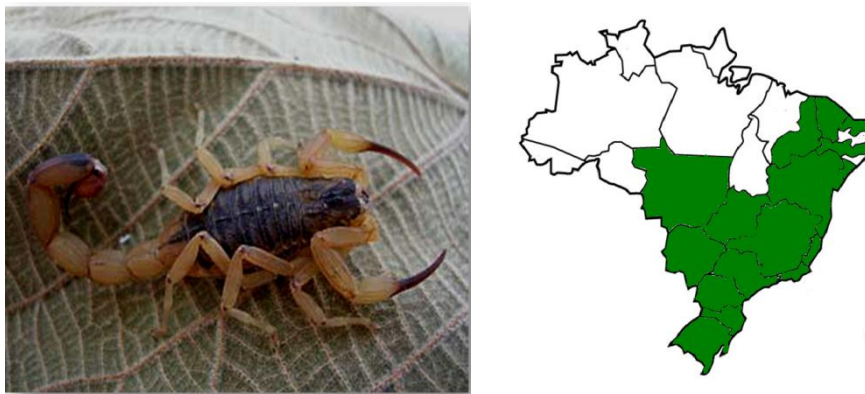


Figura 1: Escorpião *Tityus serrulatus* (Manual de controle de escorpiões / Ministério da Saúde; 2009.

Fotos: Denise Maria Candido). Mapa de distribuição geográfica

O escorpião *Tityus bahiensis*, conhecido como o escorpião marrom, de 5 a 7 cm de comprimento, possui o tronco escuro, pernas e palpos com manchas marrons escuras e cauda marrom-avermelhada e, diferentemente de *Tityus serrulatus*, esta espécie não possui serrilha na cauda. Este escorpião é responsável pela maioria dos acidentes no estado de São Paulo, porém ele pode ser encontrado nos estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 2).



Figura 2: Escorpião *Tityus bahiensis* (Manual de controle de escorpiões / Ministério da Saúde; 2009.

Fotos: Denise Maria Candido). Mapa de distribuição geográfica

O escorpião *Tityus stigmurus*, conhecido como o escorpião amarelo do nordeste, de 5 a 7 cm de comprimento, assemelha-se ao *Tityus serrulatus* tanto na coloração como nos hábitos, além da presença de serrilha, porém esta é menos acentuada nos 3º e 4º anéis da cauda. Sua diferença está na presença de uma faixa escura longitudinal na região dorsal do seu mesossoma (corpo) e outra triangular no prossoma (cabeça). Esta espécie é que causa mais acidentes no Nordeste e está presente nos estados de Pernambuco, Bahia, Ceará, Piauí, Paraíba, Alagoas, Rio Grande do Norte e Sergipe (Figura 3).



Figura 3: Escorpião *Tityus stigmurus* (Manual de controle de escorpiões / Ministério da Saúde; 2009.

Fotos: Denise Maria Candido). Mapa de distribuição geográfica

O escorpião *Tityus obscurus*, também conhecido como *Tityus paraensis* ou *Tityus cambridge* (escorpião preto da Amazônia), de 8 a 10 cm de comprimento, quando adultos possuem coloração negra, porém quando jovens possuem corpo e apêndices castanhos e manchados de marrom escuro podendo ser confundidos com outras espécies de escorpião da região da Amazônia legal (Figura 5). Esta espécie é comum na região Norte, principalmente no Pará e Amapá, podendo ser encontrados também no estado do Amazonas, Acre, Roraima, Rondônia, Maranhão e Tocantins (Figura 4).



Figura 4: Escorpião *Tityus obscurus/paraensis/cambridgei* (Manual de controle de escorpiões / Ministério da Saúde; 2009. Fotos: Denise Maria Candido). Mapa de distribuição geográfica



Figura 5: Filhote de *Tityus obscurus*. Note a diferença de coloração com os adultos dessa mesma espécie. Os filhotes são castanhos com manchas marrons escuras espalhadas pelo corpo. **Foto:** Denise Maria Candido.

1.2- Escorpionismo

O acidente escorpiônico é um problema de saúde pública em diversas regiões tropicais e não ocorrem de forma uniforme durante o ano, tendo um aumento nas épocas de calor e chuvas, porém a variação anual é pequena. A ocorrência desses acidentes aumentou nos últimos anos. Em 2010 foram notificados 50.126 acidentes, com 88 óbitos. A incidência foi de 26,3 acidentes/100.000 habitantes em relação a 2009 (25,7/100.000 habitantes) e a letalidade foi de 0,2%, sem distinção significativa entre o sexo afetado. Os maiores registros estão na faixa etária entre 20 e 49 anos, com 47,6%. As crianças entre 1 e 9 anos estão na faixa etária com maior quantidade de óbitos (39/88), principalmente naqueles que apresentam quadro clínico sistêmico e que recebem atendimento tardio com 6 horas ou mais após a picada (SINAN - Ministério da Saúde, 2011). A maioria dos óbitos ocorreu na região sudeste entre os anos de 2000/2010 com um total de 277 óbitos, sendo Minas Gerais o estado onde ocorreu a maioria das notificações, com 28 casos em 2010 (SINAN – Ministério da Saúde, 2011). Crianças abaixo de sete anos e idosos constituem um grupo de risco devido ao fato de que o sistema imune ainda está em formação ou debilitado, respectivamente (Maestri-Neto *et al*, 2008).

Os aspectos clínicos, resultado do envenenamento, são classificados em manifestações locais e sistêmicas. Os sintomas locais podem ser divididos em neurotóxicos e citotóxicos. A evidência de uma picada local pode ser mínima ou ausente em aproximadamente 50% dos casos de sintomas neurotóxicos. Os pacientes apresentam sensação de dor, seguida por coceira, eritema, inchaço no tecido e aumento de hiperestesia no local da picada que persiste por várias semanas, além de ser hipersensível ao toque e a temperatura. Nos sintomas citotóxicos, a mácula ou pápula

aparece inicialmente no local, ocorrendo dentro da primeira hora da picada. No entanto, se a lesão progredir para um aspecto roxo, poderá evoluir para uma necrose e úlcera, sendo que o diâmetro da lesão depende da quantidade do veneno injetado (Petricevich, 2010). Os sinais sistêmicos podem ser não neurológicos, os quais incluem sintomas cardiovasculares, respiratórios, gastrointestinais, genitourinário, hematológico, metabólico ou neurológico devido à liberação de catecolaminas de glândulas adrenais ou a liberação de acetilcolina dos neurônios parassimpáticos pós-ganglionares (Petricevich, 2010).

Em algumas regiões na Amazônia, alguns casos de envenenamento por *Tityus obscurus* pode causar sensações de choque, sintomas relatados por pacientes de regiões do estado do Pará (Pardal, 2003).

Recentemente foi proposta uma única classificação clínica relacionada aos sinais e sintomas do envenenamento. Estudos definem classes de envenenamento de acordo com esses sinais e sintomas. A classe I contém apenas as manifestações locais tais como sensação de ardência, eritema, hiperestesia, coceira, necrose, parestesia, dor, inchaço. A classe II apresenta manifestações sistêmicas menores e alguns dos sintomas são: agitação, convulsão, diarreia, encefalopatia, fasciculação, hemorragia gastrointestinal, hematúria, hipertensão, mioclonia, pancreatite, taquicardia, retenção urinária e vômitos. A classe III é o resultado do envenenamento severo devido a falhas no sistema nervoso central (paralisia), cardíaco (hipotensão, arritmia ventricular, bradicardia, colapso cardiovascular) ou respiratório (cianose, dispnéia e edema pulmonar) (Khattabi *et al*, 2011).

Envenenamento por espécies de escorpiões *Tityus zulianus* e *Tityus discrepans* provenientes da Venezuela, causam complicações cardiorrespiratórias, morte por lesão pulmonar e alterações pancreáticas e gastrointestinais, respectivamente. Doses

significativas da toxina do veneno de *Tityus zulianus* no sangue de humanos induzem um potente aumento na produção de peróxido em neutrófilos, podendo evoluir para necrose em doses mais elevadas, e menor produção em monócitos em comparação com *Tityus discrepans*. Entretanto, nenhum efeito foi observado em eosinófilos, sugerindo que a toxina do veneno de *Tityus zulianus* visa especificamente a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) intracelular em neutrófilos, sendo que essa alta regulação pode ser um importante alvo *in vivo* que poderia ter um papel importante nas complicações cardiorrespiratórias após o envenenamento provocado por essa espécie (Borges *et al*, 2011).

Na maioria dos casos, onde há somente o quadro local, o tratamento é sintomático e consiste no alívio da dor por infiltração de anestésico ou analgésico sistêmico. Aos pacientes picados, com formas moderadas e graves, o tratamento consiste na administração de soro antiescorpiônico (SAEsc) ou antiaracnídico (SAA). Apesar da baixa letalidade (0,2%), os casos graves e óbitos são mais frequentemente associados a acidentes por *Tityus serrulatus* em crianças. (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2010).

1.3- O veneno do escorpião

O veneno do escorpião é constituído de uma mistura complexa de componentes que incluem mucopolissacarídeos, hialuronidase, fosfolipase, serotonina ou histamina, inibidores de protease e neurotoxinas (Couraud & Jover 1984). Geralmente o veneno de escorpião é conhecido por possuir proteínas neurotóxicas e peptídeos que interage com vários canais iônicos tais como de sódio, de potássio, de cálcio e de cloreto que atuam em membranas excitáveis, ligando a sítios específicos e promovendo a liberação de

neurotransmissores (Castle *et al*, 1989; Possani *et al*, 1999 e 2000). Esses peptídeos, por sua vez, são bastante estudados, pois representam uma importante ferramenta para investigar a contribuição fisiológica dos canais de íons para as células e o comportamento do organismo.

As toxinas de canais de Na^+ dependentes de voltagem (VGSCs) são as mais reativas e por isso são os principais agentes responsáveis pelos efeitos tóxicos do envenenamento por escorpião. Essas toxinas são consideradas peptídeos de cadeia longa e são classificados em duas classes: neurotoxinas α e β . As toxinas α constituem uma família de proteínas que possuem 60 a 70 resíduos de aminoácidos ligados por 4 cadeias dissulfídicas e se ligam ao sítio 3 dos VGSCs, e sua classificação está relacionada com sua específica toxicidade contra células de mamíferos e insetos, tendo como propriedade retardar ou bloquear a inativação desses canais. As toxinas β possuem 60 a 65 resíduos de aminoácidos e se ligam ao sítio 4 dos VGSCs e agem na modulação da ativação desses canais. As sequências de aminoácidos dessas toxinas α e β mostram um grau variável de sua identidade e a interação entre essas toxinas e os canais ocorrem via superfície hidrofóbica (Cologna 2009; Hille, 1992; Lewis & Garcia, 2003)

As toxinas que atuam em canais de sódio são consideradas as principais toxinas escorpiônicas por serem mais abundantes e tóxicas. Dentre estas está a toxina TsTX1 (tipo β), isolada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (Becerril *et al.*, 1997; Corrêa *et al.*, 1997; Conceição *et al.*, 2005). Esta toxina se liga no sítio 4 do canal de sódio com grande estabilidade e alta afinidade provocando alteração na ativação de canais de sódio dependentes de voltagem VGSCs (Barhanin *et al.*, 1985; Marcotte *et al.*, 1997). Outra toxina, a TsTX, também chamada de IV-5, isolada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, é uma toxina do tipo α que se liga ao sítio 3 do canal de sódio (Falqueto *et*

al., 2002) e por isso, foi utilizada como ferramenta para induzir a liberação de neurotransmissores por despolarização (Gomez et al., 1995).

A Tz1 (tipo β), isolada do veneno do escorpião *Tityus zulianus*, interfere no processo de ativação dos canais de sódio no músculo esquelético (NaV1.4), porém não é efetiva em NaV1.5 cardíaco (Borges et al, 2004). A presença das toxinas α e β de *Tityus zulianus*, afetam os canais de sódio e exibem atividades semelhantes em nAChRs (Receptores de acetilcolina nicotínico), assim como no veneno do escorpião *Buthus occitanus tunetanus*. Outros peptídeos também afetam os canais de sódio, como a Bu1 do escorpião *Buthacus macrocentrus* (Caliskan et al, 2012) e a TbScV (tipo α), uma toxina isolada do veneno do escorpião *Tityus bahiensis* que podem causar modificações tais como a redução da taxa de inativação das correntes de sódio, aumento da amplitude da corrente que causa uma alteração negativa na ativação e inativação dos canais dependentes de voltagem sensíveis à tetrodoxina (TTX-S) e isoformas de canais de NaV1.5 cardíaco. Esta toxina também causa uma pequena diminuição na amplitude das correntes dos canais de Na^+ neuronais resistentes à tetrodoxina (TTX-R) (Moraes et al, 2011). A toxina Tc49b, proveniente de *Tityus cambridgei*, afeta os canais de Na^+ de células granulares de cerebelo, porém não foi efetiva nos canais de K^+ dependente de voltagem (Batista et al, 2002a).

Existe um grupo de proteínas que atuam em canais de potássio que possuem uma nomenclatura estabelecida, proposta por Tytgat et al (1999). Este grupo pode ser dividido em quatro famílias: α KTx, β KTx, γ KTx e κ KTx (Goudet et al, 2002). Das toxinas que atuam nestes canais, a Ts15, classificada como α KTx21.1, bloqueia significativamente os canais Kv1.2, Kv1.3, *Shaker* IR e isoforma Kv1.6 na faixa de nmolar. (Cologna et al, 2011). A toxina Kappa-KTx2.5 derivada do escorpião *Opisthacanthus cayaporum* (família Liochelidae) também é capaz de bloquear as

correntes de K^+ , em especial dos subtipos hKv1.1 e hKv1.4, com alta afinidade pelo canal Kv1.4 (Camargos *et al*, 2011).

Outros peptídeos também atuam nesses canais de forma significativa como o Tc1 do veneno do escorpião *Tityus cambridgei* que bloqueia de forma reversível os canais de K^+ tipo *Shaker* B (Batista *et al* 2000). Os peptídeos Tc30 e Tc32, específicos dos canais de K^+ , do veneno desse mesmo escorpião, reconhecem com alta afinidade os canais Kv1.3, além dos canais de K^+ tipo *Shaker* B dependente de voltagem, porém com potências diferentes. O peptídeo Tc32 afeta preferencialmente as correntes de K^+ das células imune, e devido a sua estrutura primária única foi definida como uma nova subfamília de toxinas específicas para os canais de K^+ , a α KTx18.1 (Batista *et al*, 2002b).

Já no veneno do escorpião *Mesobuthus martensii*, as toxinas BmP02 e BmP03, afetam os canais de K^+ dependente de voltagem (KTxs) e possuem diferentes afinidades aos canais de K^+ tipo *Shaker*, onde são capazes de inibir as correntes de rKv1.1, rKv1.2, rKv1.3 e *Shaker* IR, porém não possui atividade detectável em rKv1.4. Além disso, apresentam diferentes afinidades aos canais rKv1.2 e rKv1.3, onde BmP02 possui mais afinidade em rKv1.2 e BmP03 para rKv1.3. Outro fator importante é que esses peptídeos bloqueiam, de forma menos eficiente, o canal de potássio rKv1.3 dependente de voltagem e ambos alteram a curva de inativação da corrente para potenciais positivos, o que diferencia de todos os venenos de escorpião derivado de KTx (Zhu *et al*, 2012).

A família κ KTx é a mais recente dentre as toxinas que atuam em canais de potássio. Entre os peptídeos pertencentes a essa família o κ -Buthitoxin-Tt2b ou κ BUTX-Tt2b do veneno de *Tityus trivittatus*, com 28 aminoácidos, é capaz de bloquear os canais de K^+ (Saucedo *et al*, 2012). As estruturas dos peptídeos κ BUTX-Tt2b e Ts16

(Bordon *et al*, 2011) mostram grande identidade com o peptídeo Tt28 (Abdel-Mottaleb *et al*, 2006) classificado de α -KTx20.1 e que também é um bom bloqueador dos canais de potássio K^+ , Kv1.2 e Kv1.3, porém não tem efeito nos canais de Kv1.1 e Kv1.4.

As toxinas dos escorpiões também podem agir no sistema nervoso central e estudos mostram que os escorpiões do gênero *Tityus*, tais como *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, podem causar algumas alterações na liberação de neurotransmissores no hipocampo e modificações comportamentais tais como o aumento na atividade eletrográfica do hipocampo resultando em descargas elétricas convulsivantes, sendo que com o veneno de *Tityus bahiensis* estas descargas são menos intensas, o que provavelmente está relacionado com as diferenças de toxicidade dos venenos (Nencione *et al*, 2009).

O veneno dos escorpiões do gênero *Tityus* também podem causar alterações no desenvolvimento físico e comportamental na prole de ratas no período pós-natal resultando em rápido desdobramento das orelhas e erupção dos incisores e em outros casos, lenta abertura dos olhos (Dorce *et al* 2009, Barão *et al*, 2008).

Relacionados aos estudos dos peptídeos do veneno dos escorpiões, as análises transcritômicas caracterizam peptídeos derivados da glândula de veneno de escorpião inibidores de protease SdPI e SdPI2. Baseado nesses ensaios, um novo peptídeo tipo Kunitz terminal SdPI foi identificado no veneno do escorpião *Lychas mucronatus* que confirma ser um potente inibidor de tripsina que está envolvida em várias reações inflamatórias no corpo humano (Zhao *et al*, 2011).

1.4- Proteínas de alto peso molecular em veneno de escorpiões

Levando em consideração a diversidade dessas toxinas e suas interações, as análises ômicas são muito utilizadas para a identificação da complexidade dos venenos.

A maioria dos estudos focam principalmente os peptídeos e proteínas de baixo peso molecular, em especial aquelas com ação nos canais iônicos (Diego-García *et al*, 2005; Rates, *et al*, 2008; D'Suze *et al*, 2009; para revisão ver De La Vega, *et al*, 2010).

Apesar de existirem poucos estudos sobre as proteínas de massa molecular acima de 10 kDa, já foi demonstrada a presença de hialuronidase (51 kDa) em *Tityus serrulatus*. Estudo, *in vivo*, mostram que esta enzima associada à toxina TsTX-I de *Tityus serrulatus* pode causar um significativo aumento nos níveis das enzimas creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LD) e aspartato aminotransferase (AST) do soro do que apenas a toxina TsTX-I, confirmando que essa enzima tem um alto fator de espraçamento, já que esta facilita a difusão da toxina dentro dos tecidos contribuindo para o envenenamento sistêmico (Pessini *et al*, 2001). Outra enzima com atividade gelatinolítica proveniente do veneno de *Tityus serrulatus*, também encontrada no veneno de *Tityus bahiensis*, foi identificada por Almeida *et al*, 2002. Esta enzima parece ser uma serinoprotease visto que ela foi inibida por inibidores de serinoprotease. Essa enzima possui atividade proteolítica, podendo agir também como fator de espraçamento aumentando a permeabilidade do tecido. Dessa forma, esta enzima pode ser responsável pelos sintomas de pancreatites observados em pacientes picados por escorpião.

Uma outra enzima proteolítica, uma metaloprotease (antarease), também foi encontrada no veneno de *Tityus serrulatus*. Esta enzima cliva proteínas de membrana associada a vesícula (VAMPs) em diferentes sítios específicos e dessa forma, pode interromper a função das VAMPs, interferindo no tráfego de vesículas intracelular e na secreção (Fletcher *et al*, 2010).

Uma outra proteína proveniente do escorpião *Hemiscorpius lepturus* da família Liochilidae foi identificada por Borchani *et al*, (2011). Essa proteína foi denominada hemicrolisina (33 kDa) e promove um efeito dermonecrótico, similar ao produzido pelo

veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. No veneno de escorpião esta proteína é uma esfingomielinase D e possui atividade hemolítica e dermonecrótica que é descrito como SMasesD.

A identificação dessas proteínas de alto peso molecular provenientes dessas diferentes espécies e a consequente descoberta da sua diversidade poderá trazer uma nova visão sobre a importância na medicina relacionada aos envenenamentos de escorpião.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo é comparar o perfil proteico dos diferentes venenos de escorpião do gênero *Tityus*: *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus* e verificar a diversidade de proteínas, de peso molecular acima de 10 kDa e se o soro antiescorpiônico (produzido com o veneno de *Tityus serrulatus*) é capaz de reconhecer as proteínas dos diferentes venenos.

Relevância

Este estudo visa auxiliar no conhecimento da diversidade das proteínas nos venenos das 3 espécies de *Tityus*, contribuindo para a compreensão da fisiopatologia do envenenamento por essas espécies de escorpiões no Brasil.

3. Materiais e Métodos

3.1- Tampões e soluções

Eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE (1-DE)

- Tampão de Amostra (2x): Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 4%; glicerol 20%; β -mercaptoetanol 10%; Tris 50 mM, pH 6,8; azul de Bromofenol 0,05%.
- Tampão de Amostra (6x): SDS 12%; glicerol 30%; β -mercaptoetanol 10%; Tris 150 mM pH 6,8; azul de Bromofenol 0,15%.
- Tampão de Corrida: Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%.
- Tampão de Separação (4X): Tris 1,5 M pH 8,8.
- Tampão Stacking (4X): Tris 0,5 M pH 6,8.
- Solução corante Coomassie Brillante Blue R: azul de coomassie R 0,1% em ácido acético 5% e metanol 25%.
- Solução Descorante: ácido acético 5% em metanol 25%.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (2-DE)

- Tampão de Corrida: Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%.
- Solução Fixadora: ácido acético 5%, etanol 40%.
- Solução corante Coomassie Brillante Blue G: sulfato de amônio 8%, ácido ortofosfórico 1%, azul de Coomassie G-250 0,1%.
- Solução de preservação: ácido acético 5%.
- Solução de equilíbrio redutora: Tris-HCl 50 mM, pH 8,4, uréia 6 M, SDS 2%, glicerol 30%, DTT 2%.

- Solução de equilíbrio alquilante: Tris-HCl 50 mM, pH 8,4, uréia 6M, SDS 2%, glicerol 30%, iodoacetamida 3%.
- Solução de Agarose: agarose 0,5%, azul de bromofenol 0,002% em tampão de corrida diluído 1X.
- Solução de Acrilamida 30% e metilbisacrilamida 0,8%.

Western Blotting

- Tampão fosfato – salina (PBS): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM; NaHPO_4 8 mM; NaCl 140 mM.
- Tampão de Transferência: Tris 24 mM, glicina 190 mM e metanol 20%.
- Tampão de Lavagem: Tween-20 0,2% em PBS.
- Tampão de Bloqueio: leite desnatado 5% em tampão de lavagem.
- Diluente de anticorpo: albumina bovina 1% em tampão de lavagem.
- Solução Ponceau S: Ponceau S 0,1% em ácido acético 20%.

3.2- Reagentes

- Solução de rehidratação Destreak: GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suíça.
- Tampão IPG: GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suíça.
- Coomassie Brilliant Blue G: BIORAD Lab., Hercules, CA, EUA.
- Coomassie Brilliant Blue R: BIORAD Lab., Hercules, CA, EUA.
- Soro antiescorpiônico: Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

- Anticorpo secundário: marcado com Peroxidase produzido em cabra contra IgG de cavalo, KPL, Maryland, EUA.
- Substrato Quimioluminescente Supersignal West Pico: Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA.
- Azul de Bromofenol: Plus one, Uppsala, Suíça.
- β -mercaptoetanol Molecular Biology Grade: Calbiochem, La Jolla, CA, EUA.
- Fixador (revelação manual): GBX Fixer, Kodak Co., Rochester, NY, EUA.
- Revelador (revelação manual): GBX developer, Kodak Co., Rochester, NY, EUA.
- Padrão de peso molecular baixo e alto: SDS-PAGE molecular Weight Standarts, Low Range e Hight Range, BIORAD Lab., Hercules, CA, EUA.
- Padrão de peso molecular Kaleidoscope, Prestained Standards, BIORAD Lab., Hercules, CA, EUA.

3.3- Animais e venenos

Os venenos de *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus* foram obtidos no Laboratório de Artrópode do Instituto Butantan. O escorpião *Tityus obscurus* foi coletado na região da Flona – Floresta Nacional do Tapajós, Santarém – PA, e mantidos no Laboratório de Artrópode do Instituto Butantan para posterior coleta de veneno. Os venenos foram liofilizados e solubilizados em NaCl 0,9 % (*Tityus serrulatus*) e 1,46% (*Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*). Essa diferença de

concentração de NaCl está relacionado com a melhor solubilização do veneno. Após esse procedimento, os venenos solubilizados foram aliquotados e mantidos a -20°C .

3.4- Determinação das proteínas

A determinação da concentração de proteína dos venenos foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão e reagente de Bradford (BIORAD assay protein, Hercules, CA, EUA). A absorbância foi de 620 nm, no fotômetro Multiskan EX (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

3.5- Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 1-DE)

As proteínas dos venenos (30 μg de proteína) de *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus* foram desnaturadas em tampão de amostra a 100°C por 5 min e separadas em gel de poliacrilamida em concentração 10% utilizando o sistema vertical Mini-PROTEAN (BIORAD Lab., Hercules, CA, EUA). As proteínas foram coradas com corante Coomassie Brilliant Blue R-250 por 30 min ou Coomassie Brilliant Blue G-250 por 24hs e descoradas com solução descorante ou água ultrapura, por em média dois dias, respectivamente. Os géis foram digitalizados e analisados por meio do programa Quantity One (BIORAD Lab., Hercules, CA, EUA).

3.6- Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 2-DE)

3.6.1- Rehidratação das fitas:

O veneno foi precipitado (80 µg de proteína) utilizando acetona gelada na proporção 1:3 (1 volume de amostra de proteína para 3 de acetona) por 3 horas a -20° C, em seguida foi centrifugado a 14.000 g por 10 min. O pellet foi ressuscitado em 125 µl de solução de rehidratação destreak contendo 0,5% de tampão de gradiente de pH imobilizado (IPG) de pH 3-10. As amostras foram aplicadas em canaletas no IPG Box (GE-Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suíça) e as fitas posicionadas sobre as amostras e incubadas durante a noite, por no mínimo 10 horas e no máximo 18 horas.

3.6.2- Focalização Isoelétrica

Após a hidratação das fitas, foi realizada a focalização isoeletrica, utilizando o aparelho Ettan IPG Phor 3. Inicialmente as fitas foram submetidas a 100 V por 2 horas para a remoção dos sais seguido do protocolo para fitas de 7 cm (Passo 1: step 100V – 2 horas; passo 2: step 300V – 200 Vh; passo 3: gradiente 1000V – 300Vh; passo 4: gradiente 5000V – 4000Vh; passo 5: gradiente 5000V – 1250Vh), tendo um acúmulo de aproximadamente 5952 Vh. Após essa fase, as fitas foram guardadas à -80°C até a próxima etapa.

3.6.3- Equilíbrio das fitas

Após a etapa de focalização, as fitas foram equilibradas com solução de equilíbrio redutora (DTT) e solução de equilíbrio alquilante (Iodoacetamida - IAA), respectivamente, por 15 min cada, em temperatura ambiente sob agitação constante.

Devido a sensibilidade da iodoacetamida à luz, durante a fase alquilante, os tubos contendo as fitas foram envolvidos com papel alumínio.

3.6.4- Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, foi realizada utilizando o sistema vertical Mini-PROTEAN (BIORAD Lab., Hercules, CA, EUA). As fitas foram posicionadas sobre os géis de concentração de 12,5%, juntamente com o padrão de peso molecular Kaleidoscope, Prestained Standards (BIORAD Lab., Hercules, CA, EUA) (5 µl) aplicado em papel filtro, em seguida coberto com solução de agarose 0,5%. A corrida seguiu dois passos: Passo 1: 80V, 15mA e 1W por gel por 30 min e passo 2: 500V, 60mA e 13W por gel. Após esse procedimento, os géis foram incubados com solução fixadora por no mínimo 30 min. As proteínas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue G-250 por 3 dias, em seguida descorados com água destilada, digitalizados e a análise das imagens feitas por meio do software Image Master Platinum 2D.

3.7- Western Blotting

Os ensaios de Western blotting foram feitos para verificar se o soro antiescorpiônico produzido pelo Instituto Butantan é capaz de reconhecer as proteínas dos venenos desses três escorpiões. Após a técnica de SDS-PAGE (1-DE ou 2-DE), foi feita a transferência para a membrana de nitrocelulose (*Hybond-ECL-nitrocellulose*, Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suíça) por 70 min a 100V, em seguida a membrana foi corada com Ponceau por 5 min, lavada com água destilada e em seguida incubada com solução de bloqueio durante a noite. Em seguida, as membranas foram

incubadas com o soro antiescorpiônico (primário), produzido pelo Instituto Butantan (diluição 1:1000 –em diluente de anticorpo), por 2 horas, seguida por duas lavagens da membrana com tampão de lavagem por 15 min. Logo após, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de cavalo (KPL, Maryland, EUA) (diluição 1: 20.000 em diluente de anticorpo) por 30 min, seguida de três lavagens das membranas com tampão de lavagem por 15 min, à temperatura ambiente. As proteínas foram detectadas utilizando o reagente de quimioiluminescência (Supersignal West Pico: Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e visualizadas por autoradiografia ou pelo Fotodocumentador (ChemiDoc XRS da BIORAD Lab., Hercules, CA, EUA).

4. Resultados

4.1- Análise das proteínas presentes no veneno de três espécies de *Tityus*:

Abordagem SDS-PAGE 1-DE

A análise dos perfis proteicos dos géis SDS-PAGE 1-DE entre os venenos das três espécies de escorpião estudadas apresentaram diferenças nas bandas proteicas (Figura 6A). Foram detectadas três bandas comuns de 74, 60 e 46 kDa entre os venenos. A banda de 74 kDa do veneno de *Tityus bahiensis* possui densidade três vezes maior e o veneno de *Tityus obscurus* duas vezes maior que a do veneno de *Tityus serrulatus* (Tabela 1). A banda de 46 kDa do veneno de *Tityus serrulatus* possui densidade 2 vezes maior que a do veneno de *Tityus bahiensis* e 2.5 vezes maior que a do veneno de *Tityus obscurus* (Tabela 1). A banda de 60 kDa não possui diferença significativa entre os venenos (Tabela 1). Entre os venenos de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* foram detectadas bandas comuns de 36 e 16 kDa com densidades semelhantes (Tabela 1). Foram detectadas duas bandas de aproximadamente 63 e 41 kDa exclusivas do veneno de *Tityus serrulatus* e três bandas de aproximadamente 37, 33 e 22 kDa exclusivas no veneno de *Tityus obscurus* (Figura 6A). O veneno do escorpião *Tityus bahiensis* não apresentou nenhuma banda exclusiva. As bandas abaixo de 14 kDa apresentam um perfil comum para os três venenos (figura 6A).

O próximo passo foi verificar se o soro antiescorpiônico produzido no Instituto Butantan, onde se utiliza somente o veneno de *Tityus serrulatus* para o seu preparo, é capaz de reconhecer as proteínas presentes no veneno de *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*. Como esperado, o soro antiescorpiônico reconhece todas as proteínas do veneno de *Tityus serrulatus*, no entanto, não reconhece as proteínas de 16 e 22 kDa do

veneno de *Tityus bahiensis* e de *Tityus obscurus* respectivamente (figura 6 B). Além disso, foi observado que o soro antiescorpionico não reconheceu as proteínas abaixo de 14kDa do veneno de *Tityus bahiensis* e de *Tityus obscurus*.

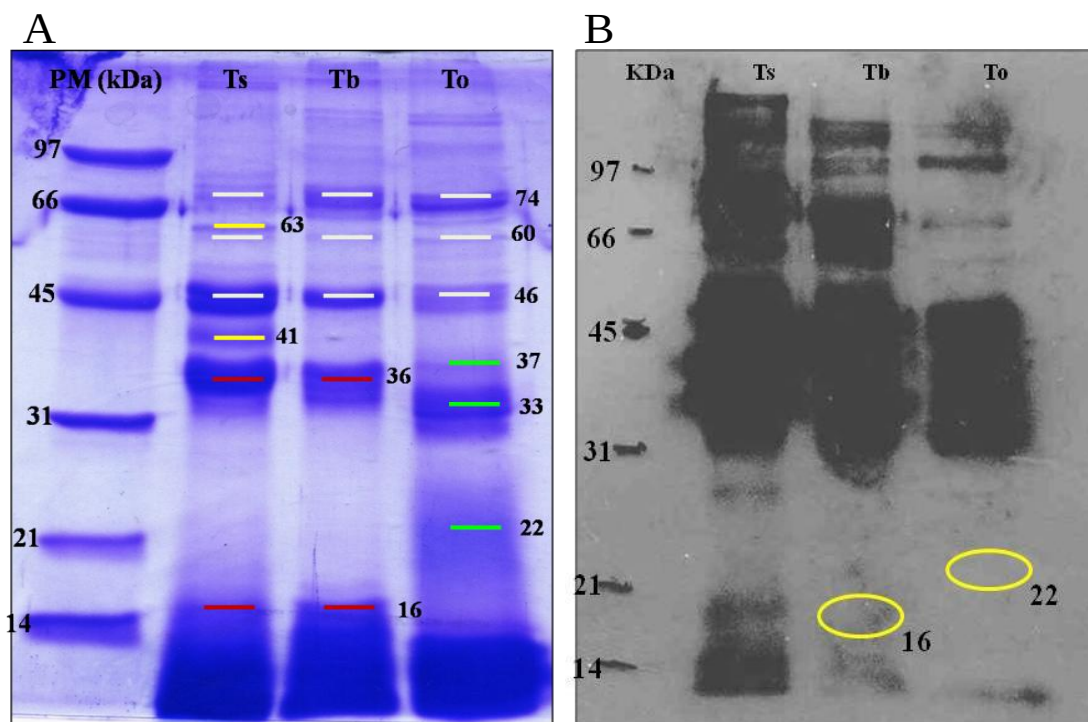


Figura 6: Análise comparativa do perfil proteico do veneno de três espécies de escorpião do gênero *Tityus*. **A) SDS-PAGE 1-DE 10%:** Veneno *T. serrulatus* (Ts); *T. bahiensis* (Tb) e *T. obscurus* (To). Note a diferença no perfil proteico dos 3 venenos. O veneno das três espécies possuem três bandas em comum 74, 60 e 46 kDa (branco). Duas bandas de aproximadamente 36 e 16 kDa estão presentes em Ts e Tb (vermelho). Duas bandas de aproximadamente 63 e 41 kDa são exclusivas do veneno de Ts (amarelo) e três bandas de 37, 33 e 22 kDa são exclusivas do veneno de To (verde). O veneno de Tb não apresenta bandas exclusivas. **B) Western blotting** utilizando o soro antiescorpionico produzido no Instituto Butantan. Bandas de 16 e 22 kDa e bandas abaixo de 14kDa não foram reconhecidas em *T. bahiensis* e *T. obscurus*.

Tabela 1: Densidade das bandas comuns entre os venenos de *Tityus serrulatus* (Ts), *Tityus bahiensis* (Ts) e *Tityus obscurus* (Ts).

MM (kDa)	Densidade das bandas		
	<i>Ts</i>	<i>Tb</i>	<i>To</i>
74	6.344	19.097	13.849
60	5.649	8.165	8.301
46	28.867	13.842	11.362
36	28.824	27.756	_____
16	29.986	29.692	_____

Número em **negrito** representa a banda com maior densidade entre os venenos estudados.

4.2- Análise das proteínas presentes no veneno de três espécies de *Tityus*:

Abordagem SDS-PAGE 2-DE

A análise dos géis bidimensionais, realizada no software Platinum 7.0, nos permitiu uma comparação entre os diferentes venenos estudados. Foi possível constatar uma expressiva diferença entre os perfis proteicos dos venenos de *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*. No veneno de *Tityus serrulatus* foram detectados 81 *spots* exclusivos, enquanto que no veneno de *Tityus bahiensis* foram encontrados 73 *spots* e no veneno de *Tityus obscurus* 81 *spots*. Entre os venenos de *Tityus serrulatus* (Ts), *Tityus bahiensis* (Tb) e *Tityus obscurus* (To) foram detectados 8 *spots* comuns, entre Ts e To 10 *spots*, entre Ts e Tb 15 *spots* e entre Tb e To 10 *spots* (Figura 7). Na Figura 8A, 9A e 10A mostramos os *spots* exclusivos e comuns.

A massa molecular e o pI de cada spot comum entre as espécies são apresentados nas tabelas abaixo, assim como suas respectivas densidades. Nas análises das densidades dos spots comuns entre os venenos foram consideradas significantes quando as diferenças das densidades foram maiores que duas vezes.

Ao analisar as densidades dos spots comuns entre *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus* verificamos que os spots 1 e 2 são mais densos no veneno de *Tityus bahiensis*, o spot 15 é mais denso no veneno de *Tityus obscurus* e o spot 17 é mais denso no veneno de *Tityus serrulatus* (Tabela 2). Comparando os spots comuns entre os venenos de *Tityus serrulatus* e *Tityus obscurus*, o spot 6 é mais denso no veneno de *Tityus obscurus* e os spots 7 e 8 são mais densos no veneno de *Tityus serrulatus* (Tabela 3). Quando a comparação é feita entre os venenos de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, os spots comuns 27, 28, 30, 35 e 36 são mais abundantes no veneno de *Tityus serrulatus*, enquanto que o spot 24 é mais abundante no veneno de *Tityus bahiensis* (Tabela 4). Na comparação dos spots comuns entre os venenos de *Tityus obscurus* e *Tityus bahiensis*, os spots 2 e 4 foram mais abundantes no veneno de *Tityus bahiensis* e os spots 5, 12 e 13 foram mais abundantes no veneno de *Tityus obscurus* (Tabela 5).

Os ensaios de Western blotting de géis SDS-PAGE 2-DE demonstraram que o soro antiescorpiônico reconheceu todas as proteínas do veneno de *Tityus serrulatus*. Com relação aos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*, o soro antiescorpiônico reconheceu as proteínas acima de 30 kDa aproximadamente, porém não reconheceu as proteínas de menor massa molecular (Figuras 8B, 9B e 10B).

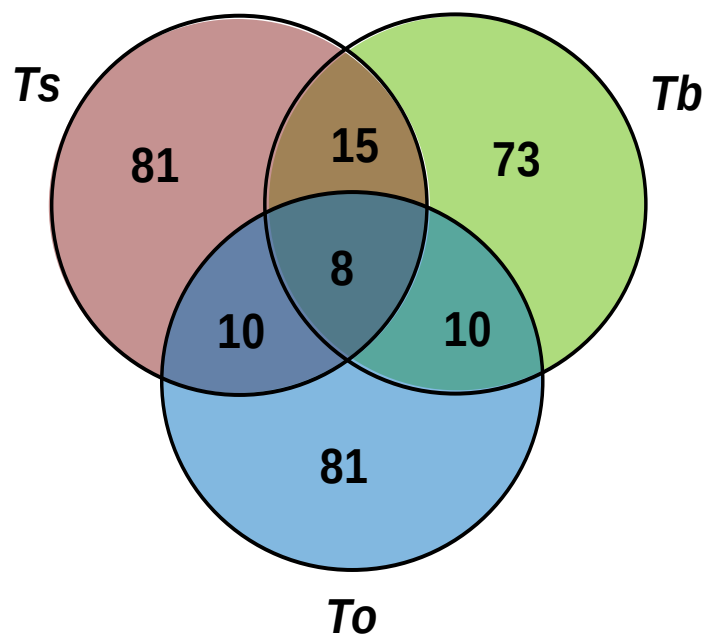


Figura 7: Diagrama de Venn representando a análise comparativa dos géis SDS-PAGE 2-DE dos venenos de *Tityus serrulatus* (Ts), *Tityus bahiensis* (Tb) e *Tityus obscurus* (To). Ensaios realizados em triplicatas.

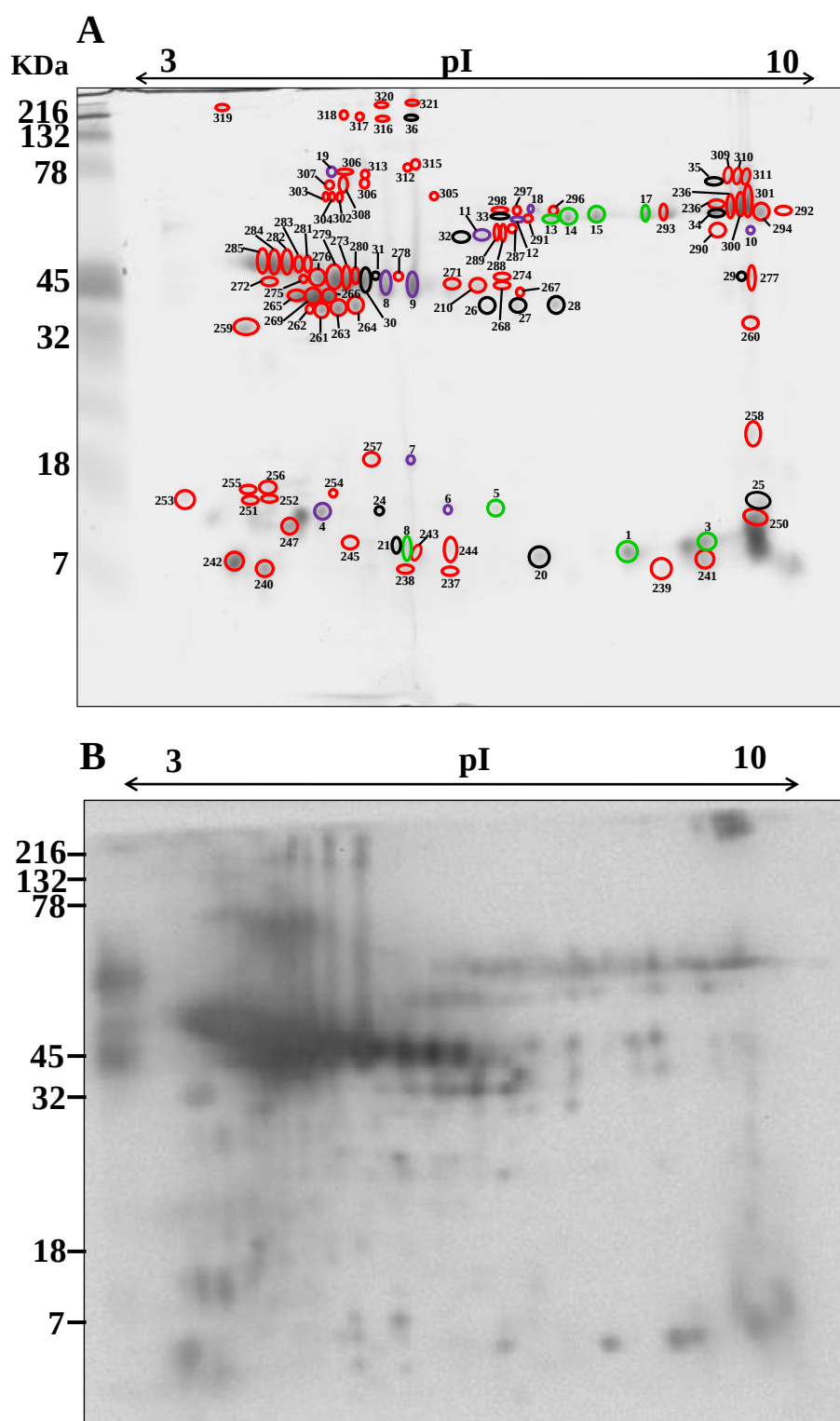


Figura 8: A) Mapa proteômico das proteínas presentes no veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. Gel SDS-PAGE 2-DE representativo do veneno de *Tityus serrulatus* realizado em triplicata. Círculos vermelhos: spots exclusivos; círculos pretos: spots comuns entre *Ts* e *Tb*; círculos roxos: spots comuns entre *Ts* e *To*; círculos verdes: spots comuns entre os três venenos. B) **Western blotting:** Soro antiescorpiônico do Instituto Butantan reconhece todas as proteínas do veneno dessa espécie.

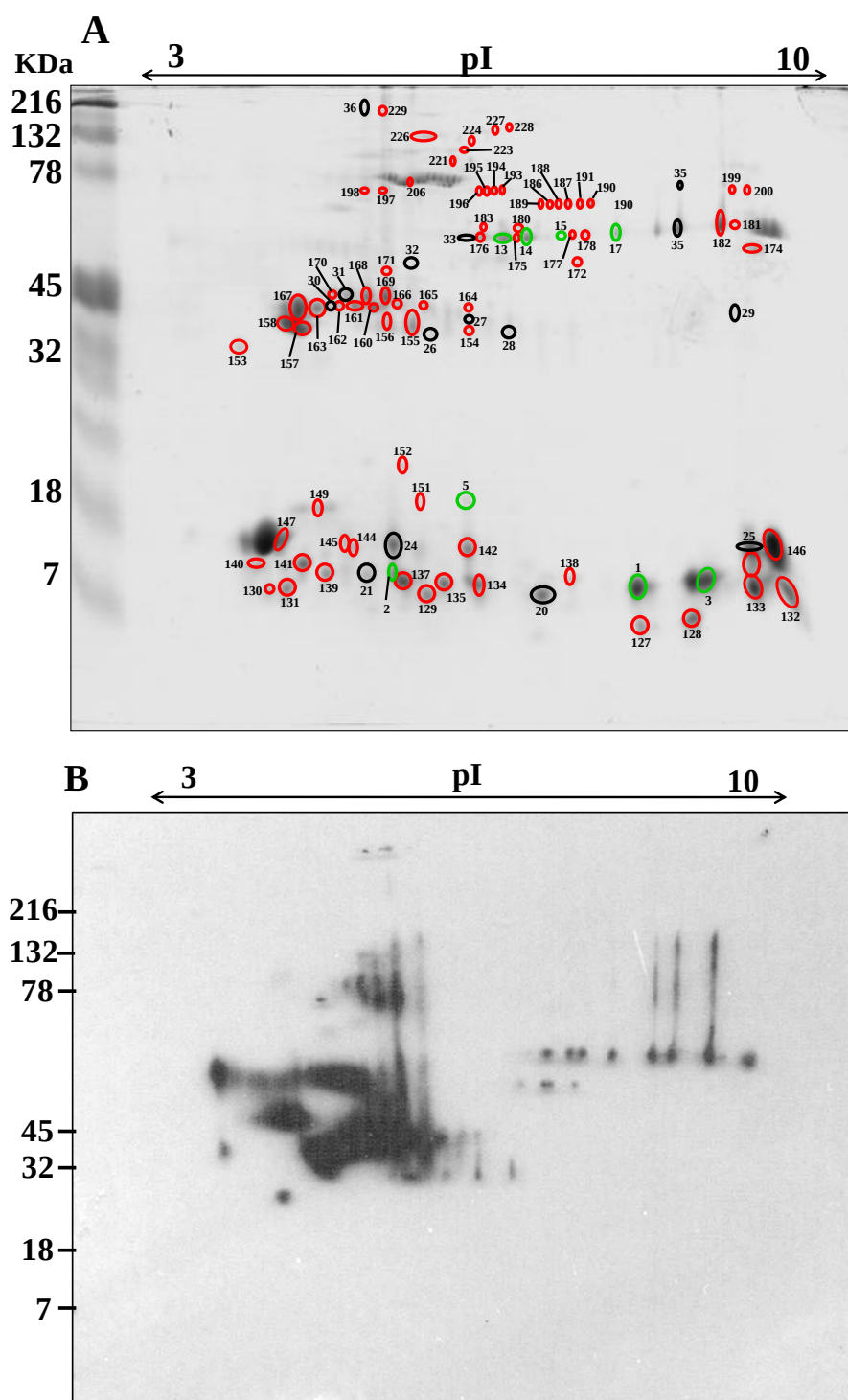


Figura 9: A) Mapa proteômico das proteínas presentes no veneno do escorpião *Tityus bahiensis*. Gel SDS-PAGE 2-DE representativo do veneno de *Tityus bahiensis* realizado em triplicata. Círculos vermelhos: spots exclusivos; círculos pretos: spots comuns entre *Ts* e *Tb*; círculos verdes: spots comuns entre os três venenos. **B) Western blotting:** Soro antiescorpiônico do Instituto Butantan reconhece as proteínas de massa molecular acima de 30 kDa, porém não reconhece as proteínas de menor massa molecular.

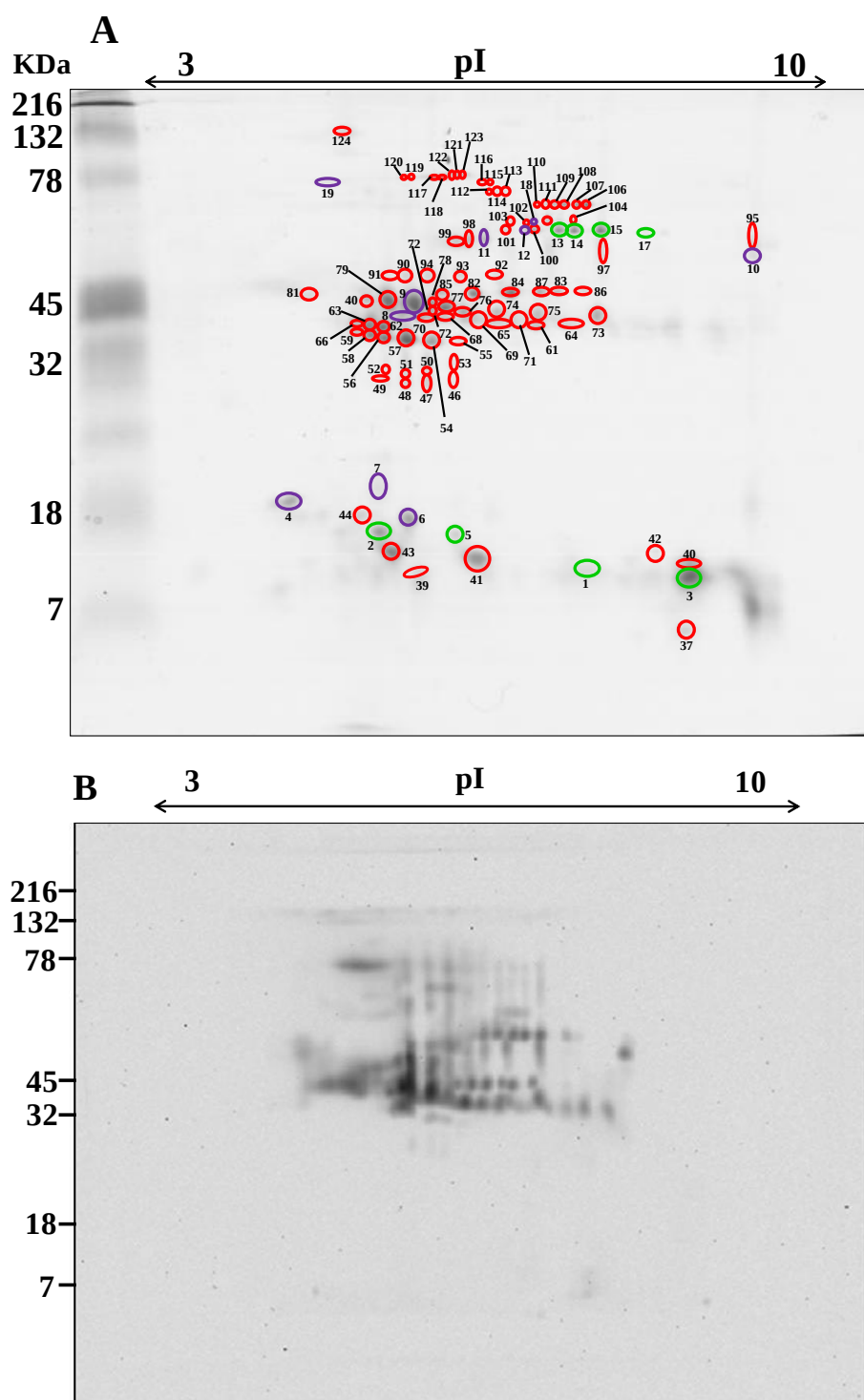


Figura 10: A) Mapa proteômico das proteínas presentes no veneno do escorpião *Tityus obscurus*. Gel SDS-PAGE 2-DE representativo do veneno de *Tityus obscurus* realizado em triplicata. Círculos vermelhos: spots exclusivos; círculos roxo: spots comuns entre *Ts* e *To*; círculos verdes: spots comuns entre os três venenos. B) **Western blotting:** Soro antiescorpiônico do Instituto Butantan reconhece as proteínas de massa molecular acima de 30 kDa, porém não reconhece as proteínas de menor massa molecular.

Tabela 2: Massa molecular, pI e densidade dos spots comuns entre os venenos de *Tityus serrulatus* (Ts), *Tityus bahiensis* (Tb) e *Tityus obscurus* (To).

<i>Ts, Tb e To</i> (ID spots)	MM (kDa)	pI	Densidade dos spots		
			<i>Ts</i>	<i>Tb</i>	<i>To</i>
1	9	7	0.148	0.284^c	0.0263
2	10	5	0.055	0.135	0.109
3	10	8	0.143	0.253	0.223
5	14	6	0.0457	0.0293	0.0392
13	61	7	0.0871	0.132	0.122
14	61	7	0.143	0.139	0.141
15	62	7	0.149	0.0187	0.163^c
17	63	8	0.168	0.0582 ^c	0.0234

Números em **negrito** evidenciam os spots com maior densidade entre os veneno estudados.

Tabela 3: Massa molecular, pI e densidade dos spots comuns entre os venenos de *Tityus serrulatus* (Ts) e *Tityus obscurus* (To).

Ts e To (ID spots)	MM (kDa)	pI	Densidade dos spots	
			<i>Ts</i>	<i>To</i>
4	13	4	0.132	0.0943
6	13	5	0.0363	0.106
7	19	5	0.0711	0.0272
8	43	5	0.162	0.0582
9	43	5	0.269	0.219
10	57	9	0.026	0.0311
11	55	6	0.0563	0.0615
12	61	6	0.048	0.056
18	63	6	0.0563	0.0421
19	77	4	0.0255	0.0217

Números em **negrito** evidenciam os spots com maior densidade entre mos venenos estudados.

Tabela 4: Massa molecular, pI e densidade dos spots comuns entre os venenos de *Tityus serrulatus* (Ts) e *Tityus bahiensis* (Tb).

<i>Ts e Tb</i> (ID spots)	MM (kDa)	pI	Densidade dos spots	
			<i>Ts</i>	<i>Tb</i>
20	8	7	0.0713	0.142
21	9	5	0.0514	0.0453
24	13	5	0.0382	0.148
25	14	9	0.0684	0.0611
26	39	6	0.0235	0.0306
27	39	6	0.0562	0.0281
28	39	7	0.081	0.0222
29	45	9	0.0375	0.0224
30	43	5	0.203	0.0307
31	46	5	0.0791	0.0693
32	55	6	0.0278	0.0174
33	61	6	0.0298	0.0384
34	63	8	0.197	0.143
35	73	8	0.0814	0.0303
36	203	5	0.165	0.0202

Números em **negrito** evidenciam os spots com maior densidade entre os venenos estudados.

Tabela 5: Massa molecular, pI e densidade dos spots comuns entre os venenos de *Tityus obscurus* (os) e *Tityus bahiensis* (Tb).

<i>To</i> e <i>Tb</i> (ID spots)	MM (kDa)	pI	Densidade dos spots	
			<i>To</i>	<i>Tb</i>
0	11	6	0.129	0.142
2	10	7	0.0263	0.284
3	9	8	0.223	0.222
4	11	8	0.105	0.499
5	35	5	0.107	0.0306
11	57	6	0.0476	0.0384
12	60	7	0.122	0.0215
13	60	7	0.163	0.0582
15	60	8	0.0234	0.143
17	77	6	0.0682	0.0997

Números em **negrito** evidenciam os spots com maior densidade entre os venenos estudados.

5. Discussão

Os escorpiões do gênero *Tityus* (Família Buthidae) são causadores de inúmeros acidentes e os sinais e sintomas decorrentes do envenenamento são devido aos componentes do veneno tais como peptídeos e neurotoxinas (Couraud e Jover, 1984), sendo que os mais estudados são os que possuem ação em canais iônicos (Castle *et al*, 1989 e Possani *et al*, 1999). Já os componentes de alta massa molecular são pouco estudados, no entanto, podem ter um papel fundamental no envenenamento (Pessini *et al*, 2001; Almeida *et al*, 2002; Fletcher *et al*, 2010 e Borchani *et al*, 2011).

Neste trabalho, nós verificamos que os venenos das três espécies de escorpiões apresentam diferenças significativas nos perfis proteicos. Essas diferenças podem explicar as diferenças na toxicidade encontradas entre os venenos dessas espécies (Nencione *et al*, 2009, Nishikawa *et al*, 1994). Essas alterações podem ser resultantes de variações interespecíficas que possivelmente explicam as diferenças na atividade e potência dos venenos, que por sua vez, podem estar implicados nos diferentes sintomas do envenenamento por escorpiões do gênero *Tityus* (Borja-Oliveira *et al*, 2009).

Nishikawa *et al* (1994) também demonstraram diferenças no perfil proteico dos venenos das espécies de escorpiões *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus cambridgei* (*Tityus obscurus*). Porém, o perfil proteico observado em *Tityus serrulatus* apresenta menor quantidade de bandas comparadas ao exposto neste trabalho. As bandas detectadas em todos os venenos, no trabalho de Nishikawa e colaboradores, estão de 340 a 12,6 kDa, detectadas. Esses dados corroboram com os nossos resultados. No nosso trabalho a faixa de massa molecular das bandas proteicas encontrada também foi ampla, no entanto detectamos várias bandas de baixa massa molecular (menores que 10 kDa).

Com relação às bandas exclusivas do veneno de *Tityus obscurus*, a banda de 33 kDa, pode estar relacionada com a proteína Heminecrolisina (~33 kDa) do veneno de *Hemiscorpius lepturus* (Família Liochilidae) identificada por Borchani *et al* (2011), apesar de serem de famílias diferentes. Essa proteína também encontrada no veneno das aranhas possui efeito hemolítico, porém os dados em relação a proteína de *Tityus obscurus* ainda não foram analisados.

Nas análises dos géis SDS-PAGE 2-DE podemos verificar que a maioria dos spots estão localizados nas regiões acima de 32 kDa nos venenos das três espécies analisadas, principalmente no perfil do veneno de *Tityus obscurus*. A análise de transcriptômica apresentados previamente por Oliveira *et al.* (2012) demonstraram uma grande quantidade de transcritos de metaloprotease na glândula de veneno de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*. Outros estudos feitos por Cajado *et al.* (2011), utilizando o veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, evidenciaram a presença de uma metaloprotease com alta atividade proteolítica.

Outra análise transcriptômica feito por Almeida *et al* (2012) com veneno de *Tityus stigmurus*, através da construção de bibliotecas de cDNA e sequenciamento de DNA a partir dos clones obtidos, identificaram transcritos de metaloproteases, e algumas de suas sequencias de nucleotídeos são semelhantes à antarease. A proteína antarease possui aproximadamente 25,5 kDa, sendo esta massa molecular próxima ao valor da banda de 22 kDa presente no veneno de *Tityus obscurus*. Com isso, é possível inferir a presença das metaloproteases, o que pode ser uma evidência de que essas proteínas sejam um dos principais componentes do veneno dos escorpiões do gênero *Tityus*.

O soro antiescorpiônico, produzido pelo Instituto Butantan contra o veneno de *Tityus serrulatus*, reconhece todas as proteínas deste veneno, no entanto, não reconhece

as proteínas de 16 e 22 kDa dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*, respectivamente, além das proteínas abaixo de 14 kDa em ensaios de eletroforese unidimensional e abaixo de 18 kDa em eletroforese bidimensional. Além disso, podemos observar que a banda de 16 kDa que (1-DE) aparece tanto no veneno de *Tityus serrulatus* como no veneno de *Tityus bahiensis* só é reconhecida pelo soro antiescorpiônico no veneno de *Tityus serrulatus*, indicando que apesar da mesma massa molecular elas representam proteínas diferentes.

Estudos feitos por Nishikawa *et al* (1994) utilizando anticorpos monovalentes (antisoro de *Tityus serrulatus*) e bivalentes (antisoro de *Tityus serrulatus* + *Tityus bahiensis*) demonstraram, em ensaios de imunoeletroforese, muitas linhas de precipitação com o veneno de *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus* e *Tityus costatus*, no entanto somente poucas linhas de precipitação foi vistas com o veneno de *Tityus cambridgei* (*Tityus obscurus*) e *Tityus metuendus*. Quando a análise foi realizada por Western Blotting, a maioria das bandas dos venenos foram reveladas, sendo que as bandas de baixa massa molecular dos venenos de *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus* e *Tityus costatus* foram também detectados. Em nosso trabalho o soro antiescorpiônico revelou bandas acima de 30 kDa de todos os venenos estudados, no entanto as bandas de baixa massa molecular dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus* não foram reconhecidas

Embora existam poucos estudos com proteínas de alta massa molecular, já se tem trabalhos que evidenciam a importância dessas proteínas, que podem estar relacionadas aos processos fisiopatológicos resultantes do envenenamento por escorpiões.

Em resumo, nossos resultados mostraram diferenças significativas entre os venenos analisados, sugerindo que as proteínas de alta massa molecular podem ter um

papel significativo no envenenamento causando diferentes sintomatologias e toxicidade dos venenos das diferentes espécies de escorpiões do gênero *Tityus*. Essa diferença no conteúdo proteico foi confirmado nos ensaios de Western Blotting, onde o soro antiescorpiônico não reconheceu todas as proteínas dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*.

6. Conclusão

Nosso trabalho mostra que os venenos de escorpiões possuem várias proteínas e que estas podem ter um papel relevante no envenenamento. Além disso, apesar de pertencerem ao mesmo gênero, os venenos das espécies estudadas apresentaram diferenças significativas no seu conteúdo proteico. O estudo mais detalhado dessas proteínas possibilitará uma melhor compreensão da fisiopatologia do envenenamento e consequentemente poderá contribuir para o tratamento de pacientes picados por escorpiões no Brasil.

7. Referências Bibliográficas

Abdel-Mottaleb Y., Coronas F.V., Roodt A.R., Possani L.D., Tytgat J. **A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new a-KTX subfamily.** FEBS Letters 580, 2006, 592–596.

Almeida D.D, Scortecci K.C., Kobashi L.S., Agnez-Lima L.F., Medeiros S.R.B., Silva-Junior A.A., Junqueira-de-Azevedo I.L.M.; Fernandes-Pedrosa M.F. **Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey.** BMC Genomics 2012, 13:362.

Almeida FM, Pimenta AMC De Figueiredo SG, Santoro MM Martin-Eauclaire, MF Diniz CR, De Lima ME. **Enzymes with gelanolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms.** Toxicon 40: 1041-1045, 2002.

Barhanin J, Meiri H, Pauron D, Lazdunski M. **A monoclonal immunotoxin acting on the sodium channel, with properties similar to those of a scorpion toxin.** Proc Natl Acad Sci USA; 82: 1842-6, 1985.

Barão A.A.S; Bellot R.G.; Dorce V.A.C. **Developmental effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rat offspring.** Brain Research Bulletin 76, 2008, 499–504.

Batista C.V.F., Gómez-Lagunas F., De la Vega R.C.R., Hajdu P., Panyi G., Gáspár R., Possani L.D. **Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus***

***cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K⁺-channels with distinctly different affinities.** Biochimica et Biophysica Acta 1601 (2002) 123– 131.

Batista C.V.F., Zamudio F.Z., Lucas S., Fox J.W., Frau A., Prestipino G., Possani L.D. **Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺ - channels.** Toxicon 40: 557-562, 2002.

Batista C.V.F., Gomez-Lagunas F., Lucas S., Possani L.D. **Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K.-channels.** FEBS Letters 486, 2000, 117- 120.

Becerril B, Marangoni S, Possani LD. **Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*.** Toxicon; 35: 821-835, 1997

Borchani L., Sassi A., Shahbazzadeh D, Strub JM, Tounsi-Guetteti H.e, Boubaker M.S., Akbari A.f, Dorsselaer A.V., Ayeb M.E. **Heminecrolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom.** Toxicon 2011, doi:10.1016/j.toxicon.2011.05.016.

Borges A., Alfonzo M.J., García C.C., Winand N.J., Leipold E., Heinemann S.H. **Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel b-toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*.** Toxicon 43: 671–684, 2004.

Borges A., Op den Camp H.J.M., De Sanctis J.B. **Specific activation of human neutrophils by scorpion venom: A flow cytometry assessment.** *Toxicology in Vitro* 25: 358–367, 2011.

Borja-Oliveira C.R., Pertinhez T.A., Rodrigues-Simioni L., Spisni A.; **Positive inotropic effects of *Tityus cambridgei* and *T. serrulatus* scorpion venoms on skeletal muscle;** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149: 404–408, 2009.

Caliskan F., Quintero-Hernández V., Restano-Cassulini R., Batista C.V.F., Zamudio F.Z., Coronas F.I., Possani L.D. **Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: General characterization of the venom and description of Bu1, a potent mammalian Na⁺-channel α -toxin.** *Toxicon* (2012), doi:10.1016/j.toxicon.2011.12.013.

Cardoso J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Haddad Jr, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes.** São Paulo, SARVIER, 2003.

Castle N.A., Haylett D.G e Jenkinson D.H. **Toxins in the characterization of potassium channels.** Elsevier Science Publishers Ltd (UK), TINS, Vol 12, No 2, 1989.

Cologna C.T, Peigneur S., Rosa J.C., Selistre-de-Araujo H.S., Varanda W.A., Tytgat J., Arantes E.C. **Purification and characterization of Ts15, the first member of a new α -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*.** *Toxicon* 58: 54–61, 2011.

Cologna C.T., Marcussi S., Giglio J.R., Soares A.M. and Arantes E.C. ***Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins: An Overview**. Protein & Peptide Letters, 16, 920-932, 2009.

Camargos T.S., Restano-Cassulini R., Possani L.D., Peigneur S., Tytgat J., Schwartz C.A., Alves E.M.C., Freitas S.M., Schwartz E.F. **The new kappa-KTx 2.5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum***. Peptides 32: 1509–1517, 2011.

Conceição IM, Jurkiewicz A, Fonseca DR, Opperman AR, Freitas TA, Lebrun I, Garcez-do-Carmo L. **Selective release of ATP from sympathetic nerves of rat vas deferens by the toxin TsTX-I from brazilian scorpion *Tityus serrulatus***. Br J Pharmacol; 144: 519-27, 2005.

Corrêa MM, Sampaio SV, Lopes RA, Mancuso LC, Cunha OAB, Franco JJ, Giglio JR. **Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I**. Toxicon; 35: 1053-67, 1997.

Couraud F, Jover E. **Mechanism of action of scorpion toxins**. In: Tu, T. A. Handbook of Natural Toxins, vol. II. Insect poisons, allergens, and other invertebrate venoms. New York: Marcel Dekker Inc.. p. 659-678, 1984.

De La Vega RCR, Schwartz EF, Possani LD. **Mining on scorpion venom biodiversity**. Toxicon, 56: 1155-1161, 2010.

Diego-García E, Batista CVF, García-Gomez BI, Lucas S, Candido DM, Gómez-Lagunas F, Possani LD. **The brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: gene, peptides and function.** Toxicon, 45: 273-283, 2005.

Dorce AL.C., Bellot R.G., Dorce V.A.C., Nencione AL.A. **Effects of prenatal exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom on rat offspring development.** Reproductive Toxicology 28: 365–370, 2009.

D'Suze S.; Schwartz E.F., García-Gómez B.I.; Sevcik C.; Possani L.D.; **Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*;** Biochimie 91: 1010–1019, 2009.

Falqueto E.B., Massensini A.R., Moraes-Santos T., Gómez M.V., Romano-Silva M. **Modulation of Na⁺-channels by neurotoxins produces different effects on [³H] Ach release with mobilization of distinct Ca²⁺-channels.** Cellular and Molecular Neurobiology, Vol 22, No 5/6, dez. 2002.

Fletcher P.L., Jr., Fletcher M.D., Weninger K., Anderson T.E., Martin B.M. **Vesicle-associated Membrane Protein (VAMP) Cleavage by a New Metalloprotease from the Brazilian Scorpion *Tityus serrulatus*.** THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 285, NO. 10, pp. 7405–7416, 2010.

Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado MAM. **Effects of tityustoxin on central nervous system.** Journal of Toxicology – Toxins Reviews; 14: 437–456, 1995.

Goudet C, Chi C.W., Tytgat J. **An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensii* Karsch.** *Toxicon* 40: 1239–1258, 2002.

Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

Hadley N.F. **Adaptacional Biology of Desert Scorpions.** *J. Arachnol.* 2 :11-23, 1974.

Hille, B. **Axons, Ions, and Dons.** *Science*, 1992, 258 (5079), 144-145.

Khattabi A., Soulaymani-Bencheikha R, Achour S, Salmie L.R. **Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 364– 369, 2011.

Lewis, R.J.; Garcia, M.L. **Therapeutical potential of venom peptides.** *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, 2(10), 790-802.

M. Ismail. **The scorpion envenoming syndrome.** Review Article; *Toxicon*, Vol. 33. No. 7, pp. 82MW1.

Manual de controle de escorpiões / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

Marcotte P, Chen L, Kallen RG, Chahine M. **Effects of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on voltage-gated sodium channels.** Circ Res; 80: 363-369, 1997.

Moraes E.R., Kalapothakis E., Naves L.A., Kushmerick C. **Differential Effects of *Tityus bahiensis* Scorpion Venom on Tetrodotoxin-Sensitive and Tetrodotoxin-Resistant Sodium Currents.** Neurotox Res. 19:102–114, 2011.

Maestre-Neto A., Guedes A.B., Carmo S.F., Chalkidis H.M., Coelho J.S., Pardal P.P.O. **Aspectos do Escorpionismo no Estado do Pará-Brasil.** Rev. Para. Med. v.22 n.1 Belém mar. 2008

Nencione AL.A., Lourenço G.A., Lebrun I., Florio J.C., Dorce V.A.C. **Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats.** Neuroscience Letters 463 (2009) 234–238

Nishikawa A.K., Caricati C.P., Lima M.L., Dos Santos M.C., Kipnis T.L., Eickstedt V.R., Knysak I., Da Silva M.H., Higashi H.G., Da Silva W.D.; **Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions;** Toxicon. 1994 Aug;32(8):989-98.

Pessini A.C., Takao T.T., Cavaleiro E.C., Vichnewski W., Sampaio S.V., Giglio J.R., Arantes E.C. **A hialuronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids.** Toxicon 39: 1495-1504, 2001.

Pardal P.P.Q., Castro L.C., Jennings E., Pardal J.S.Q e Monteiro M.R.C.C. **Aspectos Epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical, 36 (3): 349 – 353, 2003, 2003.

Petricевич V.L. **Scorpion Venom and the Inflammatory Response.** Mediators of Inflammation; Vol 2010, Article ID 903295; 2010

Possani L.D., Merino E., Corona M., Bolivar F., Becerril B. **Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels.** Biochimie. 2000 Sep-Oct; 82(9-10):861-8.

Possani, L.D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J. **Scorpion toxins specific for Na⁺-channels.** Eur. J. Biochem. 264, 287±300, 1999.

Rates B, Ferraz KKF, Borges MH, Richardson M, De Lima ME, Pimenta AMC. ***Tityus serrulatus* venom peptidomics: Assessing venom peptide diversity.** Toxicon 52, p. 611–618. 2008.

Saucedo A.L., Flores-Solis D., Rodríguez de la Vega R.C., Ramírez-Cordero¹ B., Hernández-López R., Cano-Sánchez P., Navarro R.N., García-Valdés J., Coronas-Valderrama F., Roodt A., Brieba L.G., Possani L.D., Río-Portilla F.D. **New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing.** JBC Papers in Press. doi/10.1074/jbc.M111.329607, 2012.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Brasília: DATASUS Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>

Tytgat J., Chandy G., Garcia M.L., Gutman G.A., Martin-Euclaire M.F., Van der Walt J.J e Possani L.D. **A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies.** Elsevier Science Publishers Ltd (UK), vol-20, TIPS- 1999

Zhu L., Gao B., Luo L., Zhu S. **Two dyad-free Shaker-type K_p channel blockers from scorpion venom.** Toxicon (2012), doi:10.1016/j.toxicon.2011.11.016

Zhao R., Dai H., Qiu S., Li T, He Y., Ma Y., Chen Z., Wu Y., Li W., Cao Z.; **SdPI: The First Functionally Characterized Kunitz -Type Trypsin Inhibitor from Scorpion Venom.** Plosone Vol 6, Issue 11, 2011.