

ANÁLISE QUALITATIVA E ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DOS CONSTITUENTES PROTÉICOS DO VENENO BRUTO DO ESCORPIÃO *Tityus stigmurus*

Jéssica Karen Silva do Nascimento¹; Ricardo Abadie Guedes²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas Bacharelado – CCB – UFPE. E-mail: jessica.karen.s.n@gmail.com, ²Docente do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB – UFPE. E-mail: ricardo.guedes@ufpe.br

Sumário: O presente trabalho realizou a extração e a quantificação do conteúdo protéico da peçonha do escorpião *Tityus stigmurus*; avaliou o perfil de massas moleculares dos constituintes do veneno em animais adultos e juvenis; testes de toxicidade *in vitro* em diferentes linhagens de carcinoma de colo de útero, câncer de pulmão e câncer de mama. Inicialmente foi solicitada a autorização do ICMBio (MMA) para a formação de uma colônia em cativeiro dos animais. Foram utilizados 6 escorpiões adultos e 11 infantes para a realização dos experimentos. Os seis escorpiões adultos foram provenientes de doações e os onze infantes nasceram em cativeiro. O aparelho utilizado para a retirada do veneno foi produzido no próprio laboratório. As amostras extraídas não tiveram efeito significativo na inibição do crescimento das linhagens celulares *in vitro*. Os testes de inibição da atividade de acetilcolinesterase apresentou resultado significativo. A peçonha dos animais apresentou ainda constituintes diferentes para cada grupo etário, conforme análise de espectrometria de massa.

Palavras-chave: escorpião; veneno animal; citotoxicidade; espectrometria de massas

INTRODUÇÃO

O gênero *Tityus* pertencente à família Buthidae, é o mais diversificado em espécie, representa cerca de 60% da fauna escorpiônica no Brasil, com 50 espécies descritas (COLOMBO & ALENCAR, 2014), entre elas está *Tityus stigmurus* (*T. stigmurus*) considerada uma das espécies de maior importância médica (SILVA, 2012). O veneno escorpiônico é constituído basicamente por uma mistura complexa de proteínas de baixo peso molecular, aminoácidos e sais, sintetizados nas glândulas localizadas no télson, a porção final da cauda (PORTO & BRAZIL, 2010). Avanços biotecnológicos e farmacológicos mostram que os venenos e peçonhas de animais possuem uma gama de compostos bioativos, e que apenas cerca de 1% desses compostos foram bem caracterizados até o momento. Os venenos e seus compostos têm sido utilizados em pesquisas para diagnosticar doenças, como ferramenta biotecnológica para fins terapêuticos e biopesticidas (VARGAS, 2008). Isto demonstra a necessidade de mais estudos de caracterização química e de avaliação do potencial biológico de compostos bioativos presentes em venenos animais. Este estudo teve como objetivo analisar qualitativamente o veneno bruto do escorpião *T. stigmurus*, bem como a sua toxicidade *in vitro* em células cancerosas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 6 escorpiões adultos e 11 infantes para realização dos experimentos (criação em cativeiro autorizada pelo Sisbio, número 45875-1), mantidos em caixas de 38 x 26 cm, com água em abundância e alimentação (baratas) fornecida uma vez por semana para os adultos e duas vezes por semana para os infantes. A extração do veneno foi

realizada, após jejum de 15 dias dos animais, por eletroestimulação de baixa intensidade (24 volts). Em seguida, o veneno foi diluído em água deionizada, centrifugado e o sobrenadante liofilizado. Para realizar a dosagem de proteínas, foi utilizado o método de Bradford que consiste na determinação das proteínas totais da amostra através do corante “Coomassie brilliant blue”. Na avaliação da ação do veneno sobre a atividade da acetilcolinesterase, utilizamos o extrato bruto do cérebro homogeneizado do peixe *Danio rerio*, com tampão tris-HCl pH=8. Depois de homogeneizado, o extrato bruto foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para os ensaios enzimáticos de acordo com a metodologia padrão (AEBI, 1984). Para avaliar a citotoxicidade *in vitro* do veneno bruto do escorpião *Tityus stigmurus* foram realizados ensaios de viabilidade em células tumorais utilizando o método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium). As linhagens tumorais utilizadas foram a HEP2 (carcinoma de colo do útero), a NCI-H292 (câncer de pulmão) e a MCF-7 (câncer de mama), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Todas as linhagens foram plaqueadas na concentração de 1 x 10⁵ células/ml. O veneno bruto liofilizado, dissolvido em DMSO para uma concentração de 5 mg/ml, foi diluído em série no meio RPMI para obtenção da concentração final de 25 µg/ml e adicionado em placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 69 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 25 µl da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Cada amostra foi testada em duplicata em dois experimentos independentes. Para obtenção do espectro de massas moleculares foram realizadas análises em um espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF Autoflex III (BrukerDaltonics) no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Os venenos brutos, de escorpiões adultos e juvenis, liofilizados foram reconstituídos em uma mistura de acetonitrila 50%, ácido trifluoroacético 0,1% e água deionizada para uma concentração final de 1 mg/ml. A matriz utilizada foi a alfa-ciano. A aquisição dos espectros ocorreu de acordo com protocolo descrito por Pimenta et al. (2003). O programa utilizado para análise espectrométrica foi o FlexControl Versão 3.0 e para processamento dos espectros o FlexAnalysis Versão 3.0. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão dos experimentos realizados e a estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observamos alguns comportamentos dos escorpiões, dentre eles, a partenogênese ocorrida em dois animais, resultando numa ninhada de dez filhotes de uma fêmea e doze de outra. Segundo Silva (2012). Foi observado que esses filhotes não apresentam a fluorescência característica da espécie (verificada sob luz ultravioleta/negra), e que esta começa a iniciar de acordo com a independência do juvenil em relação à genitora. O fenômeno da fluorescência é comumente apresentado nos adultos sendo uma propriedade única dos escorpiões (CANDIDO & PORTO, 2010). Até o momento, não encontramos na literatura relatos dessa ausência de fluorescência em escorpiões juvenis. Acreditamos que essa ausência se dá por motivo de proteção dos infantes a possíveis predadores. Após a primeira muda foi observado que os escorpiões apresentaram a fluorescência por completo demonstrando que a partir desse momento eles estão aptos a sobreviver sozinhos. Após a extração do veneno escorpiônico, centrifugação e liofilização, fizemos a dosagem de proteínas pelo método de Bradford. Este é um método rápido e sensível para a determinação das proteínas totais em diversos meios (ZAIA et al., 1998). A concentração

proteica encontrada no veneno bruto foi de 3,43 mg/ml. Adicionalmente, avaliamos a ação do veneno bruto de *T. stigmurus* na atividade da acetilcolinesterase (AChE), importante enzima que atua no processo de transmissão do impulso nervoso. Foram testados dois grupos: 1. extrato contendo AChE sem adição do veneno (controle); 2. extrato contendo AChE com a adição do veneno (veneno). Com base nos dados obtidos, pode-se observar um efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) do veneno sobre a atividade da acetilcolinesterase. As neurotoxinas, normalmente presentes em venenos escorpiônicos, podem atuar tanto na região pré-sináptica quanto na pós-sináptica repercutindo em uma liberação excessiva de neurotransmissores como epinefrina, norepinefrina, glutamato, aspartato e acetilcolina, além disso, também podem atuar na inibição da AChE (OZKAN et al., 2007). Dessa forma, as neurotoxinas presentes no veneno de *T. stigmurus* (ALMEIDA et al., 2013) podem estar envolvidas no processo de inibição da atividade da AChE observada neste estudo. O ensaio de citotoxicidade do veneno de *T. stigmurus* foi realizado nas linhagens celulares tumorais: NCI-H292, MCF-7 e HEP-2. Os resultados indicaram que o veneno bruto do escorpião não provocou efeito citotóxico significativo nas células testadas. Apesar dos resultados iniciais indicarem, previamente, que o veneno de *T. stigmurus* não age inibindo o crescimento das células tumorais, há a necessidade da realização de mais testes, inclusive em outras linhagens celulares, para comprovação dos resultados. Neste trabalho, analisamos o perfil de massas moleculares da fração solúvel do veneno bruto de *T. stigmurus* obtido em espectrômetro de massa MALDI-TOF. Foram analisados e comparados o veneno extraído dos escorpiões adultos e o veneno dos escorpiões infantis. No veneno dos escorpiões adultos foram identificados cerca de 180 componentes com massas moleculares que variaram de 908,7 a 39.374,3 Da. Contudo, no veneno dos escorpiões infantis foram identificados cerca de 225 componentes com massas moleculares entre 716,5 e 39.633,9 Da. Em estudo similar, Batista e cols. (2007) analisaram a proteômica do veneno de *T. stigmurus* e conseguiram identificar as massas moleculares de cerca de cem componentes distintos entre 216,5 e 44.800,0 Da. Determinar o número exato de biomoléculas presentes no veneno escorpiônico é uma tarefa difícil, a síntese desses compostos depende de variáveis intrínsecas e extrínsecas ao animal, como por exemplo idade dos escorpiões e a técnica usada na extração da peçonha (BATISTA et al., 2004). Na análise dos espectros de massas, encontramos, tanto no veneno dos animais adultos quanto no dos infantis, cinco compostos com massas moleculares similares a de peptídeos relatados na literatura presentes no veneno de *T. stigmurus* (BATISTA et al., 2007). Os peptídeos são a butantoxina, Tst-17, Tst-3, Tst β KTx e Pape.

CONCLUSÕES

Determinamos, através da espectrometria de massa, que o veneno dos escorpiões dessa espécie, capturados na cidade de Recife, apresentam um perfil de constituintes que varia dependendo da idade. Houve inibição da atividade de acetilcolinesterase, o que sugere que o veneno desses escorpiões pode ter a capacidade de induzir o aumento da atividade colinérgica, na ocorrência do acidente escorpiônico. A não inibição do crescimento celular, nas linhagens utilizadas nos testes de citotoxicidade *in vitro*, sugere que, pelo protocolo executado, a peçonha não apresentou, em seus constituintes, agente capaz de inibir o crescimento de células tumorais.

AGRADECIMENTOS

À UFPE e ao CETENE (em especial à Aldenise Lizandra e Júlia Campos) pelo apoio na execução dos experimentos. À Jéssica Vasconcelos, prof.^a Gardênia Militão e Dijanah Cota pela grande colaboração nos experimentos e discussão dos dados. A todos do Laboratório de Fisiologia Comparada e Comportamento Animal pela ajuda e companheirismo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D.D.; TORRES, T.M.; BARBOSA, E.G.; LIMA, J.P.M.S.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: cDNA cloning homology modeling, dynamic simulations and docking. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, p. 113-118, 2013.
- BATISTA, C.V.F.; POZO, L.D.; ZAMUDIO, F.Z.; CONTRERAS, S.; BECERRIL, B.; WANKE, E.; POSSANI, L.D. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 55-66, 2004.
- BATISTA, C.V.F.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S.A.; SALAS-CASTILLO, S.P.; ZAMUDIO, F.Z.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L.D., Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 147-157, 2007.
- CANDIDO, D.M & PORTO, T.J. **Técnicas de coleta e manejo de escorpiões em cativeiro**. In: Brazil & Porto. Os Escorpiões. Editora da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010, p. 33 - 42.
- COLOMBO, W. D.; ALENCAR, I. D. C. C. Etograma do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* Lutz & Mello 1922 (Scorpiones: Buthidae), em cativeiro. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 576–581, 2014.
- OZKAN, O.; ADIGUZEL, S.; KAR, S.; KURT, M.; YAKISTIRAN, S.; CESARETLI, Y.; ORMAN, M.; KARAER, Z. Effects of *androctonus crassicauda* (olivier, 1807) (scorpiones: buthidae) venom on rats: correlation among acetylcholinesterase activities and electrolytes levels. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, p. 69-81, 2007.
- PIMENTA, A.M.C.; ALMEIDA, F.M.; LIMA, M.E.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F., BOUGIS, P.E. Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 413-418, 2003.
- PORTO, T. J.; BRAZIL, T.K. **Os Escorpiões de Importância Médica e seus Venenos**. In: Brazil & Porto. Os Escorpiões. Editora da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010, p.65- 70.
- SILVA, D.J. Escorpionismo no Brasil. 25 f. Especialização – Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.
- VARGAS, J.A.G. **Análise Proteômica Parcial da Peçonha do Escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus***. 66f. Dissertação (Mestrado) – Pós graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, 2008.
- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.