



**Universidade de Brasília**

**Pós-Graduação em Biologia Animal**

**Análise Proteômica Parcial da Peçonha do  
Escorpião Colombiano *Centruroides margaritatus*  
(Gervais, 1841)**

Jimmy Alexander Guerrero Vargas

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Brasília**

**2008**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Dissertação de Mestrado

**Jimmy Alexander Guerrero Vargas**

Título:

**“Análise proteômica parcial da peçonha do escorpião colombiano  
*Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841)”**

Comissão Examinadora:

**Profa. Dra. Mariana de Souza Castro**  
**Presidente / Orientadora**  
**UnB**

**Profa. Dra. Sônia Maria de Freitas**  
**Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa**  
**UnB**

**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa**  
**UFMG**

**Prof. Dr. Osmindo Rodrigues Pires Junior**  
**Membro Suplente**  
**Interno Vinculado ao Programa**  
**UnB**

Brasília, 14 de março de 2008.

## DEDICATÓRIA

Ao meu filho Nicolás Guerrero Rivas e a minha esposa Maria del Pilar Rivas Pava

A minha avó Cornelia Villaquiran

A minha mãe María Elena Vargas

Na memória de meu pai Hector Guerrero

Aos meus irmãos Hector Andrés e Sara Patricia Guerrero Vargas

Aos meus tios Jesús, Rodrigo e Fernando Vargas

## **AGRADECIMENTOS**

Desejo expressar meus mais sinceros agradecimentos às seguintes instituições e pessoas.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, por me permitir realizar meus estudos de mestrado.

Ao centro Brasileiro de Serviços e Pesquisas em Proteínas e ao Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, pelo apoio e pela infra-estrutura disponível para o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos de mestrado.

À Fundação Universidade de Brasília, pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Centro de Pesquisas Biomédicas e ao Museu de Historia Natural da Universidade do Cauca em Colômbia, pelo apoio e me permitir fazer parte deste projeto em suas instalações.

A minha pequena mas grande família, meu filho Nicolás Guerrero Rivas e minha esposa María del Pilar Rivas por ser o motivo de minha inspiração, por fornecer para mim muitos momentos de infinita alegria e por aceitar e apoiar meu afastamento de suas vidas durante o desenvolvimento de meus estudos de pós-graduação.

A minha orientadora Dra. Mariana de Souza Castro por quem estou infinitamente agradecido por seu valioso apoio, sua grande amizade, confiança e paciência, e por todos os conhecimentos transmitidos durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Dr. Marcelo Valle de Sousa, coordenador científico do Centro Brasileiro de Serviços e Pesquisas em Proteínas, pelo apoio, incentivo e confiança na realização desta pesquisa.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Dr. Wagner Fontes, Dr. Carlos André O. Ricart, Dr. Ricardo Bastos Cunha, Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima e MSc. Pedro Portugal Zanotta, pelo apoio, amizade e sugestões.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Nuno Manuel Domingues por sua amizade e por compartilhar muitas “dicas” e conhecimentos no uso dos equipamentos do laboratório, Antônio Rufino por sua grande amizade, sua ótima colaboração e os muitos bate-papos na copa do laboratório, e Fábio Coelho por seu apoio técnico.

Aos professores do Laboratório de Toxinologia da Universidade de Brasília. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz, Dr. Carlos Schwartz e Dr. Osmino R. Pires Júnior, pelo apoio, amizade, incentivo e sugestões feitas no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Santiago Ayerbe, diretor do Museu de História Natural da Universidade do Cauca e coordenador do Grupo de Pesquisas Herpetológicas e Toxinológicas (GIHT), Colômbia por seu apoio, valiosa amizade, sugestões e confiança depositadas em mim.

Ao MSc. José Beltrán, coordenador do Centro de Pesquisas Biomédicas da Universidade do Cauca, Colômbia, por seu apoio e por autorizar o desenvolvimento de parte desta pesquisa neste Centro.

Ao Taxidermista do Museu de História Natural da Universidade do Cauca Jaime Ramírez Mosquera, por sua colaboração na construção do aparelho gerador de impulsos elétricos.

A minha família, em especial a minha avô por todo seu apoio e amor, a minha mãe María Elena Vargas por seu apoio, ajuda e compreensão, a meus tios Jesús, Rodrigo e Fernando Vargas por sua valiosa e desinteressada ajuda, a meus irmãos Hector Andrés e Sara Patrica Guerrero, por sua ajuda, apoio e pelo infinito carinho que têm por mim.

Aos meus amigos Andrés Chantré, Francia Arrieta, Rosa Amália Dueñas e Javier Rodríguez integrantes do GIHT da Universidade do Cauca, Colômbia, por todo

seu apoio nas saídas de campo para coletar os escorpiões, ajuda na extração da peçonha e manutenção em cativeiro.

Aos meus amigos brasileiros de bancada no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Adriana Magalhães, Michelle Libério, Anna Christina Nascimento, Camila Miranda Costa, Elaine Nascimento, Luciana Amaral, Liz Maria Batista, Rafael, Gabriel Braga, Carlos Garcia, Rayner Myr pelos “bate-papos” científicos e não-científicos, pelas sugestões, pelas “dicas” e pela amizade compartilhada ao longo desses dois anos.

Aos meus amigos estrangeiros do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Liudy García, cubana, por sua ótima amizade, colaboração e todos esses bons momentos com a “galera” do Bloco C, Diana Gómez, colombiana, por sua grande amizade e carinho, Sebastien Charneau, francês, por sua ótima amizade, apoio e ajuda no laboratório.

Ao Gabriel Costa Nunes da Cruz por ser esse grande amigo, com o qual compartilhei muitos bons momentos no laboratório, no futebol, por ter paciência e me ajudar com meu português, fazendo correções e por me ensinar que os brasileiros são gente muito pero muito boa.

A minhas boas amigas do Laboratório de Toxinologia, Thalitha Soares Camargos, Edelyn Cristina Nunes Silva e Natiela Beatriz de Oliveira por sua ajuda, apoio e “bate-papos” sobre as peçonhas escorpiônicas.

Aos meus grandes amigos de moradia, “irmãos” de coração, Fernand Díaz Franco, colombiano, e Edgar Jonhny Amaya Simeon, peruano, por suas ótimas amizades, pelos momentos inesquecíveis de alegrias compartilhados em nossa *kitnet* e em nossas vidas.

Aos meus bons amigos colombianos de ótimos momentos, de ajuda mútua em qualquer ocasião, Carolina Santamaría, Ángela Rosales, Natalia Zuñiga, Diana Muñoz, Carolina Rivero Daniel Muñoz, Carlos Uribe, Diego Felipe Sánchez, Jorge Calderón Minda e o peruano Sebastian Ujevic Tonino.

Aos meus amigos colombianos Carolina Sanchez, Claudia Gómez, Bibiani Rojas, Renata Moreno, Aníbal Perea, Wladimir Paez Guerra, Yesid Castro, Nelson Ortiz, Diego Reyes e Augusto Acosta.

Aos meus amigos brasileiros Eriko Rosas e sua mãe Gilca Rosas, por sua ótima amizade.

A Nara Irléia de Siqueira por sua grande ajuda quando foi secretaria da Pós-Graduação em Biologia Animal.

E, por último, a todas aquelas pessoas que de algum modo colaboraram para a realização deste trabalho de pesquisa.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OS ESCORPIÕES	1
1.2. ESCORPIONISMO	4
1.3. ALVOS MOLECULARES DAS NEUROTOXINAS ESCORPIÔNICAS	6
1.3.1. CANAIS PARA SÓDIO EM VERTEBRADOS	6
1.3.2. CANAIS PARA SÓDIO EM INSETOS	8
1.3.3. CANAIS PARA POTÁSSIO	8
1.3.4. CANAIS PARA CÁLCIO E CLORETO	9
1.4. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DE ESCORPIÕES.	11
1.5. A PEÇONHA DE ESCORPIÕES COLOMBIANOS	14
1.6. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TOXINAS PRESENTES NAS PEÇONHAS DE ESCORPIÕES COLOMBIANOS	15
1.7. ANÁLISE PROTEÔMICA.	15
1.8. ANÁLISE PROTEÔMICA DAS PEÇONHAS DE ESCORPIÕES	18
1.9. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DAS TOXINAS ESCORPIÔNICAS	20
2. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. COLETA DOS ESCORPIÕES	24
4.2. MANUTENÇÃO DOS ESCORPIÕES EM CATIVEIRO	24
4.3. DETERMINAÇÃO TAXONÔMICA	24
4.4. OBTENÇÃO DA PEÇONHA BRUTA	24
4.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS	24
4.6. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA BRUTA	25
4.7. ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	25
4.8. OBTENÇÃO DE TOXINAS PURAS	25
4.9. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO	25
4.10. SEQÜENCIAMENTO QUÍMICO N-TERMINAL	26
4.11. ANÁLISES COMPUTACIONAIS	26



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	28
5.2. COLETA DE ESCORPIÕES	30
5.3. DETERMINAÇÃO TAXONÔMICA	31
5.4. OBTENÇÃO DA PEÇONHA BRUTA	32
5.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY	38
5.6. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA BRUTA	39
5.7. ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	41
5.8. SEQÜENCIAMENTO QUÍMICO	50
6. CONCLUSÕES	52
7. BIBLIOGRAFIA	54

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Morfologia externa de um escorpião.	2
Figura 2. Representação esquemática do arranjo transmembrânico da subunidade $\alpha$ do canal para sódio voltagem-dependente.	7
Figura 3. Representação esquemática da subunidade $\alpha$ do canal para potássio de eucariotos.	10
Figura 4. Representação esquemática dos domínios transmembrânicos presentes no canal para cálcio.	11
Figura 5. Representação esquemática da ionização promovida por MALDI	17
Figura 6. Representação esquemática da ionização promovida por ESI	18
Figura 7. Esquema geral da estratégia experimental empregada no isolamento e caracterização de peptídeos bioativos presentes na peçonha de <i>C. margaritatus</i> .	27
Figura 8. Mapa da área de estudo, Bacia do rio Patía, Estado do Cauca, Colômbia.	29
Figura 9. (A) Coleta de escorpiões durante o dia. (B) Coleta durante a noite com lâmpada de luz u.v. (C) Manutenção em terrários.	30
Figura 10. Representação esquemática das relações entre a Toxinologia e as ciências básica e aplicada.	32
Figura 11. Extração da peçonha bruta de <i>C. margaritatus</i> por estimulação elétrica.	32
Figura 12. Dosagem de proteínas pelo método de Lowry.	39
Figura 13. Perfil cromatográfico típico do fracionamento da peçonha de <i>C. margaritatus</i> em coluna de fase reversa $C_8$ .	40
Figura 14. Intervalos de massas moleculares dos componentes presentes na peçonha de <i>C. margaritatus</i> .	43
Figura 15. Porcentagem de moléculas com possível atividade biológica.	45
Figura 16. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina nativa.	46
Figura 17. (A) Recromatografia por RP-HPLC da fração Cm10 em coluna $C_{18}$ (Vydac 4,6 x 250 mm). (B) Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina 2 (MgTx2) nativa.	48

Figura 18. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina 3 (MgTx3) nativa.	49
Figura 19. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina 2 (MgTx2) nativa (em verde) e reduzida e alquilada (em azul).	49
Figura 20. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina 3 (MgTx3) nativa (em verde) e reduzida e alquilada (em azul).	50
Figura 21. Alinhamento da Margatoxina 2 (MgTx2) com a Tc1, Tpa1 e Discrepina.	51
Tabela 1. Padronização da extração da peçonha de <i>C. margaritatus</i> .	34
Tabela 2. Comparação da produção de peçonha (número de gotas obtidas após estimulação elétrica) entre machos e fêmeas de <i>C. margaritatus</i> .	36
Tabela 3. Produção de peçonha em fêmeas em diferentes estágios de gravidez.	37
Tabela 4. Caracterização das massas da peçonha de <i>C. margaritatus</i>	42
Tabela 5. Número de moléculas detectadas e sua possível atividade biológica.	45
Tabela 6. Estruturas primárias das margatoxinas 2 e 3 isoladas da peçonha de <i>C. margaritatus</i> .	50

## ABREVIATURAS

ABS	Absorvância
ACN	Acetonitrila
Cm	Fração cromatográfica resultante do fracionamento em coluna C <sub>8</sub> da peçonha de <i>C. margaritatus</i>
ESI-MS	Espectrometria de Massa por Ionização por Eletropulverização
g	Gramas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HCCA	Ácido ciano-4-hidroxicinâmico
MALDI-MS	Espectrometria de Massa por Ionização e Desorção Induzida por Laser Assistida por Matriz.
MgTx	Margatoxina 1
MgTx2	Margatoxina 2
MgTx3	Margatoxina 3
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Coluna de Fase Reversa
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	Analisador de Massa por Tempo de Vôo

## LISTA DOS AMINOÁCIDOS

<b>A</b>	Alanina	<b>M</b>	Metionina
<b>C</b>	Cisteína	<b>N</b>	Asparagina
<b>D</b>	Aspartato	<b>P</b>	Prolina
<b>E</b>	Glutamato	<b>Q</b>	Glutamina
<b>F</b>	Fenilalanina	<b>R</b>	Arginina
<b>G</b>	Glicina	<b>S</b>	Serina
<b>H</b>	Histidina	<b>T</b>	Treonina
<b>I</b>	Isoleucina	<b>V</b>	Valina
<b>K</b>	Lisina	<b>W</b>	Triptofano
<b>L</b>	Leucina	<b>Y</b>	Tirosina

## RESUMO

A peçonha de escorpiões é uma mistura complexa de peptídeos que exercem sua atividade modulando canais iônicos de membranas biológicas. O presente projeto teve como objetivo central realizar a análise proteômica da peçonha do escorpião colombiano *Centruroides margaritatus*. Tal espécie é capaz de produzir acidentes moderados e graves em humanos, no entanto existe pouca informação disponível relacionada aos componentes desta peçonha. A peçonha foi obtida por estimulação elétrica aplicando-se 5 impulsos de 50 V em cada escorpião, liofilizada e armazenada a -20°C. Diferenças significativas na produção de peçonha entre machos e fêmeas e também entre fêmeas grávidas e não-grávidas foram observadas. A peçonha bruta foi submetida a fracionamento por RP-HPLC usando coluna C<sub>8</sub> (4.6 x 250 mm) e 43 frações foram eluídas, coletadas e secadas a vácuo. Todas essas frações foram analisadas por MALDI-TOF/MS e detectou-se 91 componentes com massas moleculares distintas. A peçonha de *C. margaritatus* apresenta 54% de suas toxinas no intervalo de massas moleculares de 2,5 a 6,0 kDa, no qual estão incluídas as toxinas de cadeia curta bloqueadoras de canais para potássio; 13% do total encontram-se no intervalo de 6,5 até 8,0 kDa que corresponde ao grupo das toxinas moduladoras de canais para sódio voltagem-dependentes. Finalmente, 33% dos componentes presentes na peçonha de *C. margaritatus* são pequenos compostos com 2,0 kDa que fazem parte de um grupo de moléculas raramente descrito nas peçonhas de escorpiões. Também foram isolados e caracterizados quimicamente dois novos peptídeos: a margatoxina 2 (MgTx2), com 24 resíduos de aminoácidos (MM = 2,6 kDa) e três pontes dissulfeto, pertencente à família das  $\alpha$ -KTx e a margatoxina 3 (MgTx3) com 30 resíduos de aminoácidos (MM = 3,38 kDa) e três pontes dissulfeto. Trata-se de uma molécula inédita, sem similaridade com outras descritas na literatura.

## ABSTRACT

Scorpion venoms are a complex mixture of peptides that exert their action via ion-channel modulation in biological membranes. The central objective of this project was to perform the proteomic characterization of the venom from the Colombian scorpion *Centruroides margaritatus*. This species is capable of producing moderate accidents and serious complications in humans, but little information is available related to its components. The venom was obtained by mild electrical stimulation method, applying 5 impulses of 50 V in each scorpion. It was observed differences in the production of the venom between males and females and also between pregnant and not-pregnant females. The crude venom was fractioned by RP-HPLC using a C<sub>8</sub> column (4.6 x 250 mm) and 43 fractions were collected and vacuum dried. All these fractions were analyzed by MALDI-TOF/MS and 91 distinct compounds had their molecular masses characterized. The venom of *C. margaritatus* exhibits 54% of their toxins in the molecular mass range from 2.5 to 6.0 kDa that probably includes short-chain K<sup>+</sup> channel blockers; 13% of the total are in the range from 6.5 to 8.0 kDa and may include long-chain Na<sup>+</sup> channel toxins. Finally, 33% of the components present in *C. margaritatus* venom are peptides smaller than 2.0 kDa, a group rarely described in scorpions venoms. Two novel peptides were purified and chemically characterized: margatoxin 2 (MgTx2), 24 amino acids long (MM = 2,6 kDa) and three disulfide bridges, belonging to the  $\alpha$ -KTx family and margatoxin 3 (MgTx3), 30 amino acids long (MM = 3,38 kDa) and three disulfide bridges, with no significant similarities to other scorpion neurotoxins described.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 OS ESCORPIÕES

Os escorpiões pertencem ao filo Arthropoda, sub-filo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Scorpiones. A maioria deles apresenta de 13 a 150 mm de comprimento, destacando-se as espécies *Typlochactas mitchelli*, com 9 mm de comprimento (a menor espécie conhecida) e *Hadogenes troglodytes*, que alcança até 210 mm de comprimento (Barnes, 1995).

Os escorpiões estão entre os artrópodes mais antigos que se conhecem. Seu registro fóssil data do período Siluriano e os representantes desse período eram aquáticos, possuíam brânquias e careciam de garras tarsais, sendo que as espécies atuais não diferem muito das antigas (Barnes, 1995; Seabra, 2006).

As espécies de escorpiões atualmente descritas prevalecem em regiões de climas tropicais e sub-tropicais. Estes artrópodes têm hábitos furtivos e noturnos, ocultam-se embaixo de troncos, assim como em fendas e buracos em zonas áridas ou úmidas. Também é comum encontrá-los perto de residências ou mesmo dentro delas, especialmente quando as condições higiênico-sanitárias são ruins (Barnes, 1995).

O corpo dos escorpiões está dividido em prossoma e opistossoma, sendo que este último subdivide-se em mesossoma e metassoma como ilustrado na Figura 1. A parte anterior do prossoma não apresenta divisões, neste local estão localizados dois olhos na linha mediana e até cinco olhos de cada lado. Existem seis pares de apêndices ligados a essa região: um par de quelíceras em forma de pinça, um par de palpos, quatro pares de pernas, que apresentam duas garras na extremidade. O mesossoma é formado por sete segmentos e o metassoma por cinco, sendo encontrado na extremidade do metassoma um artícolo denominado télson o qual contém um par de glândulas produtoras de veneno, que desembocam no ferrão. O orifício anal fica localizado entre o quinto segmento do metassoma e o télson (González-Sponga, 1996; Seabra, 2006; Flórez, 2007)

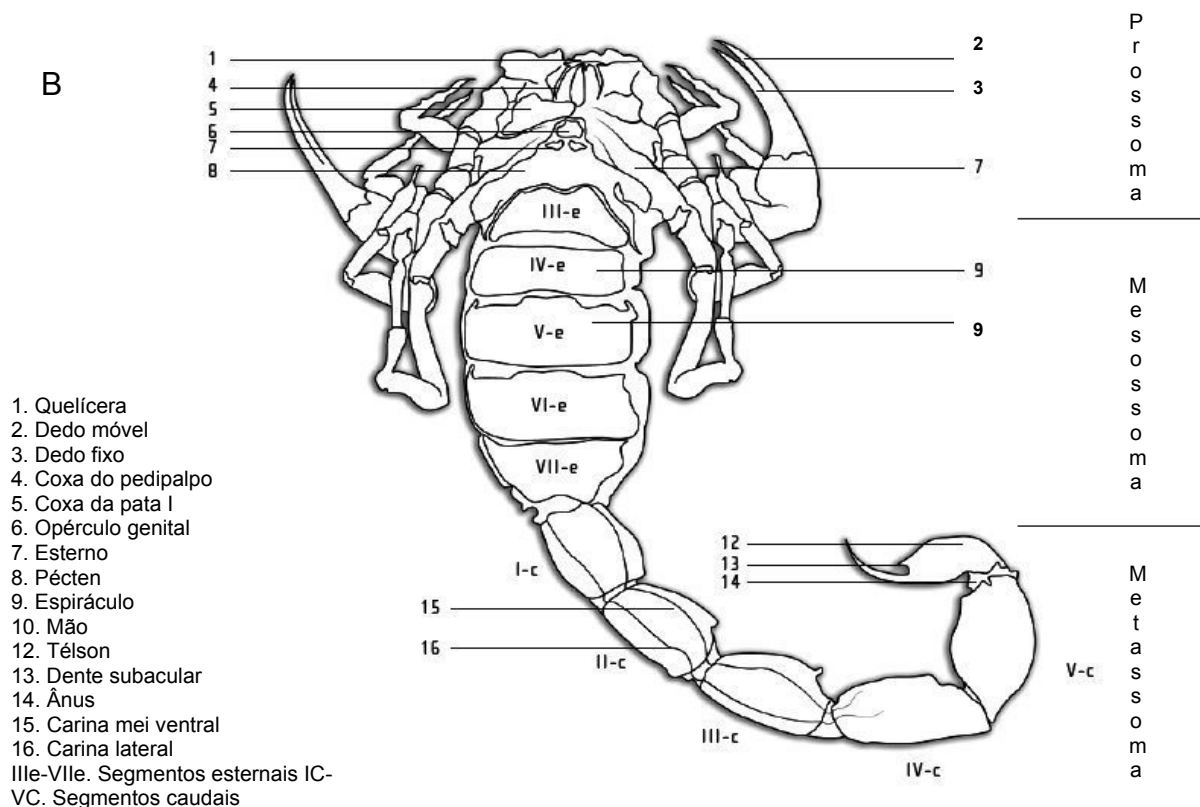
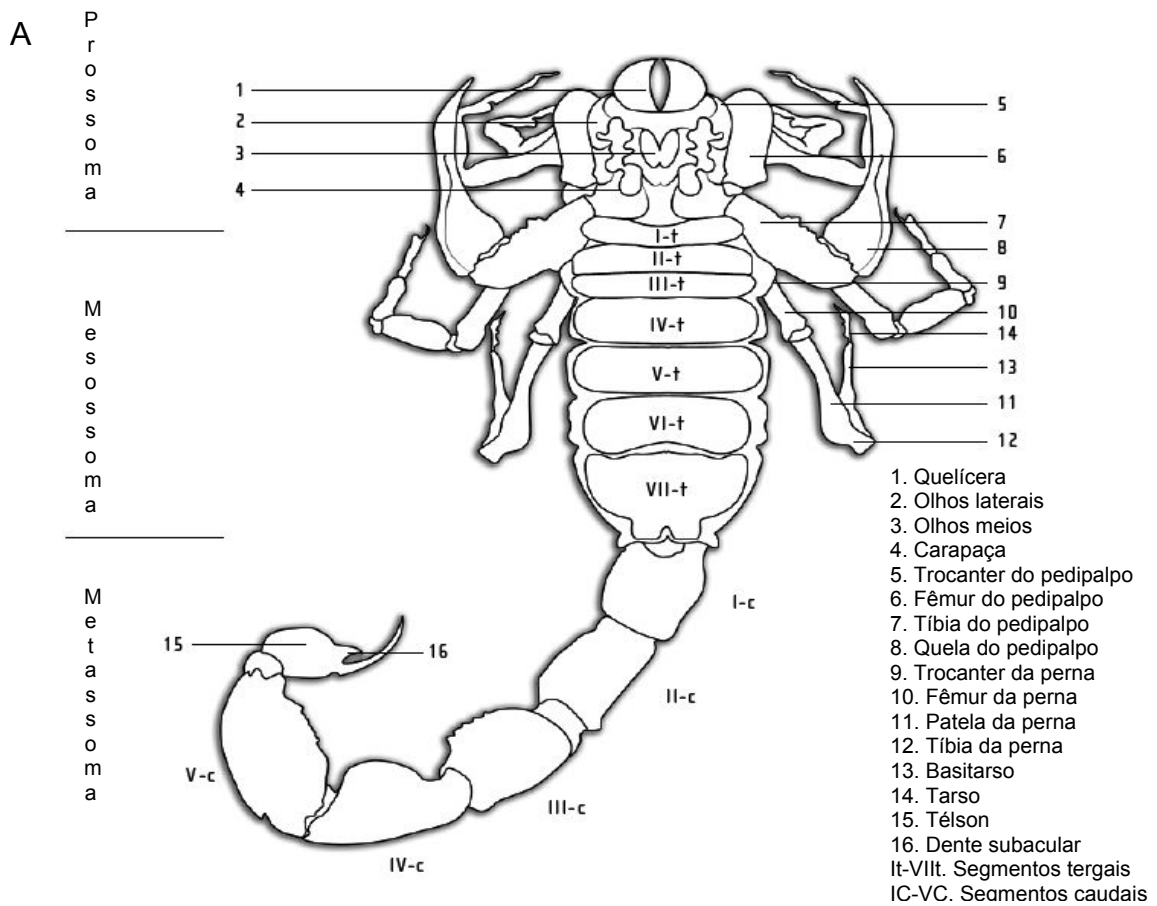


Figura 1. Morfologia externa de um escorpião (Flórez, 2007). (A). Vista dorsal. (B). Vista ventral



As toxinas de invertebrados, principalmente quelicerados, têm suscitado interesse investigativo crescente, isso em virtude de seus efeitos nocivos ao homem. Atualmente, conhece-se, com um pouco mais de detalhes, as características estruturais e funcionais de várias dessas toxinas, o que tem auxiliado enormemente no tratamento das vítimas de envenenamento, além de garantir importantes avanços nas pesquisas em biotecnologia e farmacologia (Gardiner, 1978; Ayerbe *et al.*, 2003; Kuhn-Nentwig, 2003; Favreau *et al.*, 2006).

De maneira geral, as peçonhas dos escorpiões são misturas complexas de origem apócrina (sintetizadas em glândulas exócrinas especiais) e caracterizadas por apresentarem componentes farmacologicamente ativos. Os componentes mais importantes são representados por peptídeos neurotóxicos (Loret e Hammock, 2001). Tais peptídeos apresentam toxicidade para um grande número de organismos, tais como mamíferos, insetos e crustáceos. Além dos peptídeos neurotóxicos, a peçonha contém também enzimas, nucleotídeos, lipídeos, aminas biogênicas e outros componentes ainda não identificados (Batista *et al.*, 2004).

Os peptídeos neurotóxicos podem ser agrupados em quatro grandes famílias:

1. peptídeos de cadeia curta (de 31 a 39 resíduos de aminoácidos), com três ou quatro pontes dissulfeto (García *et al.*, 2001), específicos no bloqueio dos canais para potássio presentes em membranas excitáveis;
2. peptídeos de cadeia longa (de 58 a 76 resíduos de aminoácidos), que atuam interferindo com o fluxo do íon sódio através das membranas. Estes se subdividem, por sua vez, em toxinas tipo  $\alpha$ , que interferem com a inativação dos canais para sódio voltagem-dependentes e as toxinas do tipo  $\beta$ , que alteram o mecanismo normal de abertura dos canais para sódio;
3. os peptídeos de cadeia extensa (com mais de 130 resíduos de aminoácidos), que atuam sobre a permeabilidade do íon cálcio nas membranas excitáveis (Loret e Hammock, 2001; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003; Xian-Chun *et al.*, 2004);
4. peptídeos que bloqueiam especificamente os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a rianodina (Olamendi- Portugal *et al.*, 2002).

As toxinas escorpiônicas apresentam características importantes, tais como grande estabilidade, o que as torna resistentes a mudanças no meio ambiente; alto grau de letalidade, somente excedida por algumas toxinas bacterianas e comparáveis com neurotoxinas isoladas da peçonha de serpentes; resistem a

inativação promovida por mudanças bruscas no pH, presença de agentes desnaturantes, ataque por enzimas proteolíticas ou temperaturas elevadas. As únicas substâncias que as afetam são os agentes que reduzem as pontes dissulfeto e que modificam os grupos amino e carboxi-terminais (Polis, 1990; Valderrama, 1998).

## 1.2. ESCORPIONISMO

Atualmente, são conhecidas oito famílias de escorpiões com aproximadamente 1500 espécies descritas. Na Colômbia, já foram catalogadas cerca de 50 espécies de escorpiões, distribuídas em quatro famílias: Buthidae, com representantes de quatro gêneros: *Ananteris*, *Centruroides*, *Rhopalurus* e *Tityus*; Chactidae, também com quatro gêneros: *Brotheas*, *Broteochactas*, *Chactas* e *Teuthastes*; Diplocentridae representada com apenas um gênero, *Tarsoporusus* e a família Liochelidae, com representantes de uma única espécie, *Opisthacanthus elatus* (Flórez, 2001 e 2007).

Os gêneros e espécies de interesse médico pertencem principalmente à família Buthidae. Tal família é bastante diversificada e apresenta uma ampla distribuição geográfica sobre o planeta. É a única família que contém espécies consideradas potencialmente perigosas para humanos e é dividida em 73 gêneros, 6 subgêneros, 529 espécies e 165 subespécies. Nas Américas, são largamente encontrados representantes do gênero *Tityus*, o qual é bastante numeroso, com cerca de 130 espécies (Flórez, 2001). Na Colômbia, são encontrados representantes de quatro gêneros da família Buthidae: *Ananteris* com quatro espécies, *Centruroides* com uma espécie (*C. gracilis*), *Rhopalurus* com uma espécie (*R. laticauda*) e *Tityus* com 29 espécies. No entanto, Guerrero-Vargas (2002) constatou que, além de *C. gracilis*, também é encontrada a espécie *C. margaritatus* com uma ampla distribuição ao longo do território colombiano.

Na Colômbia, os escorpiões de importância médica estão distribuídos em todo o país. Representantes do gênero *Centruroides* (com as espécies *C. gracilis* e *C. margaritatus*) são encontrados na costa atlântica e nos vales interandinos, enquanto o gênero *Tityus* (com 29 espécies) está distribuído em todo o território nacional (Guerrero-Vargas, 2002; Otero *et al.*, 2004; Flórez, 2007). Embora existam

espécies tóxicas em todo o território colombiano, os acidentes com escorpiões não são registrados pelos órgãos de saúde e muitas das pessoas envenenadas utilizam tratamentos caseiros, subestimando a gravidade desse tipo de acidente, só recorrendo aos cuidados médicos quando surgem complicações, onde o tratamento clínico reside em administrar medicamentos analgésicos e antialérgicos (Rodríguez, 2008).

As histórias clínicas de 25 casos de escorpionismo atendidos no Hospital San Rafael de Girardot, Cundinamarca, Colômbia, foram estudadas por um período de seis meses no ano de 1994 (Pineda e Castellanos, 1988) e observou-se que tais acidentes foram mais freqüentes durante o período noturno (73%) e em mulheres (56%). As extremidades são as zonas do corpo mais comumente picadas, com 30% atingindo membros superiores e 35% nos inferiores. Sua incidência ao longo do ano não sofreu variação, diferentemente do observado nos casos de escorpionismo registrados no México, onde tem sido observada uma estreita relação entre os casos de escorpionismo e as estações do ano. Os medicamentos mais utilizados foram os anti-histamínicos (88%), os glicocorticóides (32%) e adrenalina (32%).

Na Colômbia, existem registros de casos graves de envenenamento por escorpiões na região do Valle do Alto Magdalena e no Departamento de Antioquia. O segmento da população com maior risco de envenenamento sistêmico, com complicação e morte, são as crianças menores de 10 anos (Otero *et al.*, 1988). A título de exemplo, pode-se registrar a morte de uma criança de quatro anos de idade por escorpionismo em Chigorodó (Antioquia), no qual o envenenamento promoveu parada cardíaco-respiratória.

É importante mencionar que o escorpionismo foi o segundo acidente provocado por animal peçonhento mais freqüente na Colômbia (logo depois dos acidentes ofídicos) no período compreendido entre junho de 2005 e julho de 2007. Neste mesmo intervalo de tempo, foram registrados os óbitos de 4 crianças no estado de Tolima provocados pelo escorpião *Tityus pachyurus* (Base de Dados CIGITOX, 2008).

Os registros de casos de escorpionismo na Colômbia são bastante deficientes, no entanto é possível constatar que as espécies *T. pachyurus*, *T.*

*asthenes*, *T.fuehrmanni* e *Centruroides gracilis*, encontrados nos estados de Antioquia e Tolima, são as espécies mais envolvidas em acidentes graves envolvendo humanos (Gómez e Otero, 2007).

### **1.3. ALVOS MOLECULARES DAS NEUROTOXINAS ESCORPIÔNICAS**

Todos os escorpiões produzem toxinas, mas só os integrantes da família Buthidae produzem peçonhas neurotóxicas perigosas para o homem. Já é bem estabelecido que os peptídeos das peçonhas dos escorpiões atuam nas membranas celulares e são capazes de reconhecer e de se ligar a uma grande variedade de tipos e subtipos de canais iônicos, especificamente sobre os canais dos cátions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Loret e Hammock, 2001; García *et al.*, 2001; Olamendi- Portugal *et al.*, 2002; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003; Xian-Chun *et al.*, 2004). De maneira geral, uma mesma espécie de escorpião pode produzir toxinas que agem em canais para  $\text{Na}^+$  voltagem-dependentes de mamíferos, além de outras toxinas específicas dos canais para  $\text{Na}^+$  de insetos (Loret e Hammock, 2001)

#### **1.3.1. CANAIS PARA SÓDIO EM VERTEBRADOS**

O canal para  $\text{Na}^+$  é formado por uma grande proteína  $\alpha$ , com aproximadamente 260 kDa, que tem quatro domínios transmembrânicos homólogos (I-IV) e, normalmente, está associada a pequenas subunidades  $\beta$ . Cada um destes domínios possui seis regiões em  $\alpha$ -hélice (1-6) transmembrânicas (Figura 2), sendo que o sensor de voltagem está localizado na  $\alpha$ -hélice de número 4. As quatro regiões em  $\alpha$ -hélice repetidas associam-se umas com as outras formando o poro do canal (Randall, *et al.*, 2000; Catterall *et al.*, 2005; Nelson e Cox, 2005)

As toxinas que agem em canais para  $\text{Na}^+$  de vertebrados são de dois tipos: as  $\alpha$ - e as  $\beta$ -toxinas, que se diferenciam por seus efeitos farmacológicos e eletrofisiológicos (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2005). As  $\alpha$ -toxinas prolongam a fase de abertura do canal aumentando a condutância ao íon  $\text{Na}^+$ ; já as  $\beta$ -toxinas desencadeiam explosões repetitivas do canal para sódio. As  $\alpha$ -toxinas escorpiônicas diferenciam-se das  $\beta$ -toxinas por interagirem em sítios diferentes no canal para sódio. Enquanto  $\alpha$ -toxinas se ligam no sítio três (no domínio IV) da subunidade  $\alpha$ ,

retardando a inativação do canal; as  $\beta$ -toxinas se ligam ao sítio 4 (no domínio II), diminuindo o limiar de excitabilidade para a abertura do canal para sódio (Jover *et al.*, 1988; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2005).

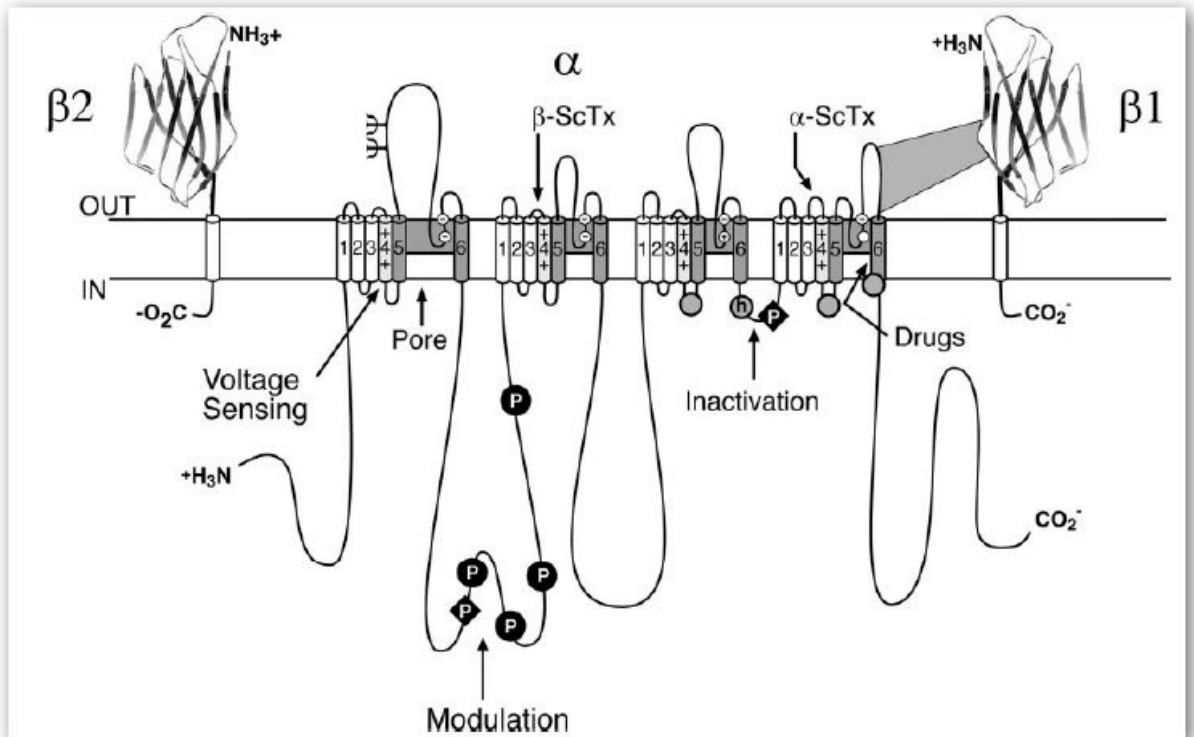


Figura 2. Representação esquemática do arranjo transmembrânico da subunidade  $\alpha$  do canal para sódio voltagem-dependente (Catterall *et al.*, 2005).

A distinção biogeográfica entre as espécies de butídeos do Velho e do Novo Mundo também se evidencia nas neurotoxinas presentes nessas espécies. As  $\alpha$ -toxinas estão presentes principalmente nas espécies de butídeos do Velho Mundo, enquanto as  $\beta$ -toxinas prevalecem nas espécies do Novo Mundo (Loret e Hammock, 2001), mas existem exceções, como a peçonha de *Leirus quinquestriatus* que, embora seja uma espécie típica do Velho Mundo, apresenta várias  $\beta$ -toxinas em sua peçonha (Rack *et al.*, 1987) e, no caso de espécies do Novo Mundo, são descritas diversas  $\alpha$ -toxinas nas peçonhas de *Centruroides exilicauda* e *C. sculpturatus* (Possani, 1984).

### 1.3.2. CANAIS PARA SODIO EM INSETOS

As peçonhas de escorpiões da família Buthidae do Velho Mundo contêm algumas toxinas que modulam canais para Na<sup>+</sup> de insetos (Loret *et al.*, 1992). Estas neurotoxinas inseto-específicas são também classificadas em  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que as  $\alpha$ -toxinas específicas para insetos tem atividade eletrofisiológica similar à observada para as  $\alpha$ -neurotoxinas específicas para canais para Na<sup>+</sup> em vertebrados (Eitan *et al.*, 1990). Já as  $\beta$ -toxinas inseto-específicas isoladas da peçonha de escorpiões do Velho Mundo não apresentam atividade similar às  $\beta$ -toxinas específicas para vertebrados presentes nas espécies de butídeos do Novo Mundo. Algumas  $\beta$ -toxinas de espécies do Novo Mundo são tóxicas a insetos (Watt e Simard, 1984), mas se ligam a canais para Na<sup>+</sup> de vertebrados e de insetos (Lima *et al.*, 1989), enquanto as  $\beta$ -toxinas de escorpiões do Velho Mundo são estritamente inseto-específicas e não apresentam efeito neurotóxico em mamíferos (Loret e Hammock, 2001).

### 1.3.3. CANAIS PARA POTÁSSIO

O canal para K<sup>+</sup> apresenta uma proteína  $\alpha$  com uma massa molecular de cerca de 70 kD, a qual possui forte homologia com as porções transmembrânicas da proteína  $\alpha$  do canal para Na<sup>+</sup>. O canal para K<sup>+</sup> funcional é formado pela associação de quatro subunidades  $\alpha$  (que podem ter seqüências idênticas ou diferentes) e quatro subunidades menores denominadas  $\beta$ . Cada subunidade  $\alpha$  possui seis regiões transmembrânicas (Figura 3) (Randall, *et al.*, 2000; Vega e Felix, 2001). Estudos cristalográficos com o canal para potássio KcsA proveniente de *Streptomyces lividans* demonstraram que tal canal é formado pela associação tetramérica das subunidades  $\beta$ , sendo sua estrutura básica formada por dois domínios transmembrânicos, conectados por uma região laço que entra e sai da bicamada lipídica. Tal laço denominado domínio P forma uma parte essencial do poro do canal. Cada subunidade  $\beta$  é formada por duas hélices transmembrânicas, uma interna ao canal e outra externa. Com relação à condução de íons potássio, estes chegam até a cavidade, rodeados de partículas de água, onde se favorece a entrada dos íons potássio no filtro de seleção visto estarem as quatro hélices do poro

na direção amino a carboxilo terminal, gerando assim um potencial eletrostático negativo e favorecendo a difusão a favor do gradiente (Doyle *et al.*, 1998).

As toxinas escorpiônicas específicas para os canais para  $K^+$  são abreviadas como KTx e são peptídeos de cadeia curta com 23 a 43 resíduos de aminoácidos unidos por três ou quatro pontes dissulfeto. Estas toxinas são comumente divididas em três famílias:  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -KTx (Tytgat *et al.*, 1999), sendo que as  $\alpha$ -KTx são empregadas como uma poderosa ferramenta em estudos farmacológicos centrados na determinação da composição das subunidades do canal, modelagem molecular da estrutura dos canais para  $K^+$  e estudo do papel funcional destes canais nos diferentes tecidos (Tytgat *et al.*, 1999; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003). A família  $\alpha$ -KTx é formada por aproximadamente 17 peptídeos de cadeia curta; já a família das  $\beta$ -KTx tem peptídeos considerados de cadeia longa com 60-64 resíduos de aminoácidos e com 6 resíduos de cisteína. Já foram descritos 4 peptídeos (TsTx-K $\beta$ , AaTx-K $\beta$ , BmTx-K $\beta^*$  e BmTx-K $\beta 2^*$ ) nessa família; finalmente, a família das  $\gamma$ -KTx contém peptídeos com 42 resíduos de aminoácidos, 4 pontes dissulfeto, que agem especificamente nos canais para  $K^+$  da família de genes (*eag*) relacionados a *ether-a-go-go*. Tais toxinas são chamadas de ergotoxinas e esta família é dividida em 5 subfamílias (Tytgat *et al.*, 1999; Corona *et al.*, 2002).

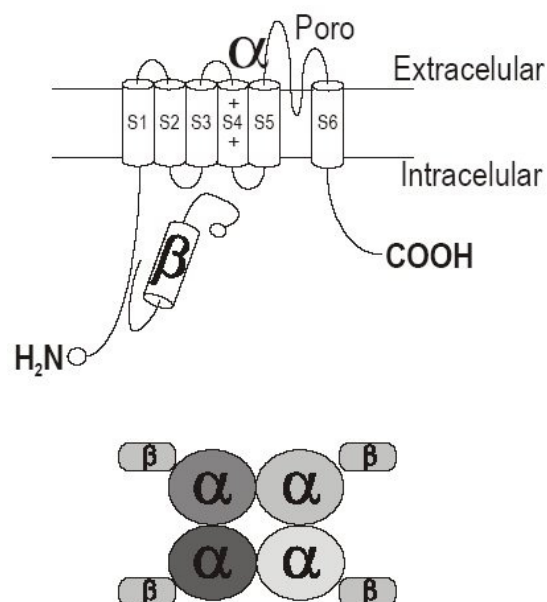


Figura 3. Representação esquemática da subunidade  $\alpha$  do canal para potássio de eucariotos (Vega e Felix, 2001).

### 1.3.4. CANAIS PARA CÁLCIO E CLORETO

Experimentos farmacológicos e eletrofisiológicos têm demonstrado que as toxinas escorpiônicas são capazes de modular a atividade de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$ , no entanto, os sítios de ação nesses canais ainda não foram caracterizados. O canal para cálcio é muito semelhante ao canal para sódio, tem uma grande subunidade  $\alpha$  associada a pequenas subunidades chamadas  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . A subunidade principal possui quatro domínios e cada um apresenta seis regiões transmembrânicas (Figura 4) (Randall, *et al.*, 2000; Catterall *et al.*, 2005; Nelson e Cox, 2005). Como exemplos de toxinas escorpiônicas moduladoras de canais para cálcio, podem-se citar a toxina II do escorpião *Centruroides limpidus*, a qual inibe fortemente a ativação dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  (Alagon *et al.*, 1998) e a peçonha de *Hottentotta hottentotta* que aumenta seletivamente as ligações de rianodina aos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  (Valvidia *et al.*, 1991). Os canais para cloreto são pouco conhecidos influenciando diretamente no número de trabalhos descrevendo moléculas que agem sobre eles, entretanto, sabe-se que a peçonha de *Leirus quinquestriatus* é capaz de promover uma significativa inibição reversível na condutância dos canais para cloreto, e a toxina responsável por tal efeito é um pequeno peptídeo de 4 kDa e quatro pontes dissulfeto que apresenta similaridade com uma classe de pequenos peptídeos inseticidas denominada clorotoxina (Debin e Strichartz, 1991). Até o momento, foram descritas mais quatro clorotoxinas: a BeIT<sub>5</sub>A, isolada da peçonha de *Buthus eupeus*, Anm P2 do escorpião *Androctonus mauretanicus*, o peptídeo I de *Buthus indicus* e o pequeno peptídeo Bm-12 isolado de *Buthus martensi* (Wu *et al.*, 2000)

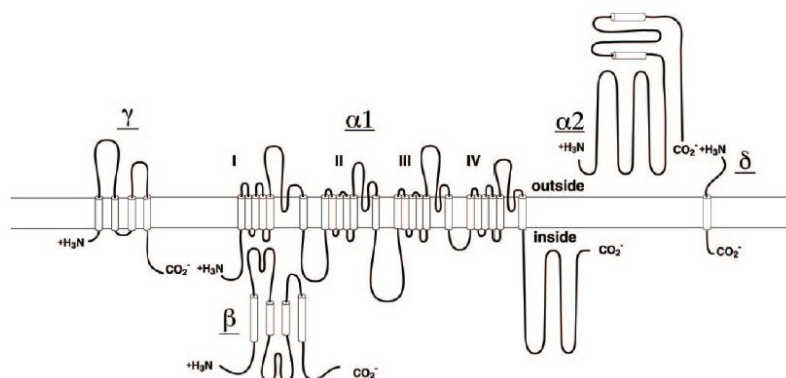


Figura 4. Representação esquemática dos domínios transmembrânicos presentes no canal para cálcio (Catterall *et al.*, 2005).



## 1.4. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DE ESCORPIÕES

Até o momento, são muitos os trabalhos e pesquisas relacionadas com o isolamento e caracterização de toxinas das peçonhas de escorpiões tanto do Novo como do Velho Mundo, envolvendo técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seqüenciamento químico por degradação de Edman, eletroforese, caracterização da atividade biológica por técnicas eletrofisiológicas e, nos últimos tempos, análise proteômica empregando-se cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. É importante ressaltar que o Brasil foi pioneiro e tem se consolidado como uma potência no desenvolvimento de tais estudos.

Trabalhos pioneiros no isolamento e caracterização de toxinas de escorpiões brasileiros foram realizados por Diniz e Gomez, ainda na década de 60, com a espécie *Tityus serrulatus* (Diniz *et al.*, 1966; Gomez & Diniz, 1966).

Em 1989, Arantes *et al.* isolaram cinco toxinas do escorpião *Tityus serrulatus* por meio de cromatografia de troca iônica, utilizando resina de carboximetilcelulose (CMC-52). Quatro destas toxinas (IX3, IX5, X4 e XIII) mostraram alta similaridade estrutural e altos níveis de letalidade. O quinto peptídeo isolado trata-se de uma nova toxina (altamente tóxica) denominada TsTX-IV, com massa molecular de 6,88 kDa e 61 resíduos de aminoácidos.

Arantes *et al.* (1994) caracterizaram uma nova neurotoxina do escorpião *Tityus serrulatus*, TsTX-V, retarda a inativação dos canais para sódio voltagem-dependentes.

Dehesa *et al.* (1994) realizaram o isolamento de uma nova toxina da peçonha do escorpião *Centruroides infamatus infamatus*, com massa molecular de 7,6 kDa e 66 resíduos de aminoácidos.

Também foi identificada uma nova toxina presente na peçonha do escorpião mexicano *Centruroides limpidus limpidus*, denominada toxina 1 de C-II (Ramírez *et al.*, 1994). Trata-se de uma toxina com 66 resíduos de aminoácidos, com alta similaridade estrutural com a toxina 1 de *Centruroides limpidus teconumanus* (91%)

e com a toxina 4 de *Centruroides noxius* (89%).

O isolamento e a caracterização de toxinas do escorpião *Orthochirus scrobiculosus* de Ásia central foi realizado por Atakuziev *et al.* (1995) combinando-se técnicas de cromatografia por filtração em gel e de troca iônica. Identificaram três toxinas com efeitos tóxicos em ratos (O5M1, O5M2 e O5M3); outras três (O5In1, O5In2 e O5In3) induzem paralisia em insetos e uma (O5Cr1) é tóxica para crustáceos. As toxinas com massas moleculares entre 6-8 kDa tiveram suas estruturas primárias determinadas.

Ao realizar o fracionamento da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* mediante técnicas cromatográficas de troca iônica, Sampaio *et al.* (1996) isolaram uma toxina extremamente homóloga à neurotoxina TsTX-I, a toxina mais letal presente na peçonha de *Tityus serrulatus*, capaz de promover excessiva liberação de neurotransmissores.

Dehesa *et al.* (1996) isolaram duas novas toxinas, cada uma com 66 resíduos de aminoácidos dos escorpiões mexicanos *Centruroides infamatus infamatus* e *Centruroides limpidus limpidus*. As suas estruturas primárias foram comparadas e apresentaram 97% de similaridade entre elas e 83% de similaridade com a toxina 2 de *Centruroides noxius*. Estas três toxinas são capazes de bloquear canais para sódio voltagem-dependentes de maneira similar.

Em 1997, Borchani *et al.* purificaram três toxinas do veneno do escorpião *Buthus occitanus tonetanus*: uma (BotIT1) com atividade contrátil e duas (BotIT4 e BotIT5) depressoras. Tais toxinas depressoras foram letais para *Blatella germanica* (110 ng/600 mg de peso corporal).

Batista *et al.* (2000) isolaram do escorpião *Tityus cambridgei* a menor toxina (com 23 resíduos de aminoácidos) bloqueadora de canais para potássio conhecida até o momento.

A peçonha dos escorpiões também produz efeitos sobre diferentes órgãos. No pâncreas, produz aumento na secreção de enzimas pancreáticas, promovendo inclusive pancreatite aguda. Os mecanismos de ação sobre ácinos e lóbulos acinares isolados estão sendo investigados (D'Suze e Sevcik, 2000).

Wagner *et al.* (2003) isolaram a primeira neurotoxina da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus fasciolatus*. Tal toxina, denominada Tf4, possui massa molecular de 6,6 kDa e ação sobre canais para sódio de rãs. Apresenta homologia com as toxinas TblT-I de *Tityus bahiensis* e TsTX-VI e TsNTXP de *Tityus serrulatus*, no entanto, Tf4 não possui toxicidade contra mamíferos e crustáceos.

Nos estudos realizados por Yamaji *et al.* (2004) foi observado que o nível de expressão das toxinas escorpiônicas depende de diferentes fatores como sexo, idade, variação genética, distribuição geográfica, etc. Tais pesquisadores identificaram, exclusivamente, em machos da espécie *Opisthacanthus madagascariensis*, uma toxina que atua em canais iônicos de potássio, denominada IsTx.

### **1.5. A PEÇONHA DE ESCORPIÕES COLOMBIANOS**

A análise histopatológica dos efeitos da peçonha do escorpião *T. pachyurus* em camundongos demonstrou alterações compatíveis com transtornos hemodinâmicos como causa principal da lesão tissular. Em geral, o dano orgânico está relacionado com disfunção miocárdica secundária ao compromisso funcional da união neuromuscular e disfunção do sistema nervoso autônomo, aumento da resistência vascular e aumento da pós-carga, fatos que levam ao paciente a sofrer uma disfunção multi-orgânica com afecção predominante do pulmão e fígado (Rodríguez, 2008).

A peçonha de *T. pachyurus* também foi avaliada quanto a sua toxicidade, características imunológicas, bem como, neutralização por três soros anti-escorpiônicos produzidos na América Latina. A DL<sub>50</sub> em camundongos foi determinada como sendo de 4,8 mg/kg e os sinais do envenenamento incluíram sialorréia, disnéia, sudorese generalizada, ataxia, alterações de comportamento e hiperglicemia. Os soros produzidos no México e no Brasil apresentaram uma dose efetiva de neutralização de 330 e 292 µg de peçonha por mL de soro, respectivamente. O soro anti-escorpiônico produzido na Venezuela não foi capaz de neutralizar a peçonha de *T. pachyurus* (Barona *et al.*, 2004).

Também já foram determinadas as características toxicológicas da peçonha de *T. fuhrmanni*: DL<sub>50</sub> em camundongos igual a 3,9 mg/kg e os sintomas do envenenamento incluem sialoréia, piloereção, sudorose e sonolência, além de taquipnéia, ataxia e convulsões (Gómez *et al.*, 2002).

No caso da peçonha de *C margaritatus* foram observados efeitos neurotóxicos em camundongos, permitindo classificá-la como uma peçonha moderadamente tóxica para mamíferos. Seus principais efeitos são dispnéia, sialorréia, piloereção, priapismo, fasciculações, perda de equilíbrio, contrações involuntárias das patas, hemorragia subcutânea na região do tórax. Também foi determinada a DL<sub>50</sub> em camundongos cepa ICR como sendo de 42,83 mg/kg e a concentração total de proteína da peçonha como de 0,11 mg por indivíduo (Guerrero-Vargas *et al.*, 2003).

## **1.6. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TOXINAS PRESENTES NAS PEÇONHAS DE ESCORPIÕES COLOMBIANOS**

Até o momento, existem apenas dois trabalhos descrevendo o isolamento e a caracterização de toxinas de escorpiões coletados em território colombiano. O primeiro desenvolvido por Guerrero-Vargas (2002) foi realizado com a peçonha de *C. margaritatus*. Foi feito o fracionamento da peçonha mediante HPLC com o uso de uma coluna de filtração em gel Protein Pack, tendo sido obtidas 9 frações. As frações, denominadas II, III, IV e V, foram utilizadas em ensaios fisiológicos procurando-se determinar seus efeitos sobre o músculo gastrocnêmico de *Bufo marinus*. As frações II e V eliminaram as contrações musculares geradas por um estímulo de 20 mV, a fração III não provocou nenhum efeito e a fração IV, em um primeiro momento, aumentou a amplitude da contração muscular e, posteriormente, provocou sua supressão.

O segundo estudo consiste na análise proteômica da peçonha do escorpião colombiano *Tityus pachyurus* (Barona *et al.*, 2006), tendo sido analisadas 77 frações cromatográficas por espectrometria de massa, com a identificação de 104 componentes diferentes. Nesse trabalho, foram isolados e caracterizados dois peptídeos tóxicos: Tpa1, um bloqueador de canais para K<sup>+</sup>, com 23 resíduos de aminoácidos, e Tpa2, uma toxina moduladora de canais para Na<sup>+</sup> de 65 resíduos de aminoácidos.

## 1.7. ANÁLISE PROTEÔMICA

No caso do fracionamento de venenos e peçonhas de origem animal para estudos proteômicos é comumente empregada a cromatografia líquida de alta eficiência em colunas de fase reversa (RP-HPLC) como etapa inicial. A cromatografia de fase reversa é baseada na hidrofobicidade das moléculas a serem analisadas, e não na polaridade das mesmas, como é observado na cromatografia de fase normal (Joseph e Marsden, 1986). É bom salientar que a cromatografia de fase reversa pode ser utilizada tanto em escala analítica como preparativa. Moléculas que possuem algum grau de hidrofobicidade, tais como proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, compostos orgânicos de baixa massa molecular, podem ser rapidamente fracionadas (Palma *et al.*, 2007) e, em seguida, analisadas por espectrometria de massa.

Nos últimos anos, a espectrometria de massa revolucionou o estudo de proteínas e peptídeos, proporcionando identificação rápida e com alta sensibilidade de amostras procedentes de géis 1D, 2D e de cromatografia líquida em sistema HPLC. As vantagens na identificação de moléculas empregando-se a espectrometria de massa incluem: alta sensibilidade no nível de fentomoles, identificação de várias proteínas em uma amostra, checagem da pureza de proteínas e peptídeos, identificação de isoformas protéicas, quantificação de cisteínas e localização de pontes dissulfeto, seqüenciamento de proteínas, identificação de proteínas em análise de proteomas, pesquisa de novas drogas (Cunha *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2007). Devido a sua complexidade e diversidade, os venenos animais representam uma fonte abundante de compostos bioativos (principalmente de natureza protéica ou peptídica) e, graças ao desenvolvimento de novas tecnologias, tem sido possível a realização de estudos na área de Toxinologia com pouca quantidade de veneno ou peçonha (Favreau *et al.*, 2006; Editorial, 2006).

A espectrometria de massa tem se constituído em uma das principais ferramentas utilizadas em estudos proteômicos. Trata-se de uma técnica analítica que permite a determinação precisa das massas moleculares dos compostos químicos através da separação dos íons moleculares de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ) (Siuzdak, 1996). É comum se adotar como unidade de massa molecular dos compostos químicos as chamadas unidades de massa atômica

(u.m.a.) ou Daltons (Da), os quais são definidos como 1/12 da massa de um átomo de C<sup>12</sup>.

O espectrômetro de massa é formado por cinco componentes principais: sistema de apresentação da amostra, fonte de íons, analisador, detector e processador de sinais (Palma *et al.*, 2007). Dentre estes componentes, pode-se destacar o sistema de ionização das moléculas, responsável por vaporizá-las e carregá-las eletricamente; e o analisador de massas que separa os íons resultantes de acordo com suas massas moleculares. Atualmente, duas técnicas de ionização que se complementam e se sobrepõem dominam a análise de proteínas, estas são a desorção a laser, na qual a amostra é irradiada com um feixe de laser que causa a ionização e a desorção da molécula, e a eletropulverização na qual a amostra em uma solução acidificada é pulverizada dentro de uma corrente de gás de dessolvatação, o que provoca a emissão da molécula ionizada em estado gasoso (Cunha *et al.*, 2006). Paralelamente, estas técnicas são complementadas por dois tipos de analisadores de massa, o tempo de voo (*time of flight*) que é usualmente associado à desorção a laser e o quadrupolo que é geralmente usado com eletropulverização (Cunha *et al.*, 2006). Na análise proteômica, é comum o emprego da técnica de MALDI do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, que é um método que produz vaporização e ionização de macromoléculas biológicas não-voláteis, direto da fase sólida para fase gasosa. Nesse caso, o analito é misturado com uma matriz, que é geralmente um composto orgânico de baixa massa molecular, que se cristaliza juntamente com o analito. A presença da matriz protege o analito de degradação, transferindo parte da energia vinda do laser às macromoléculas, resultando em uma leve ionização, permitindo assim, a sua detecção numa forma intacta (Figura 5).

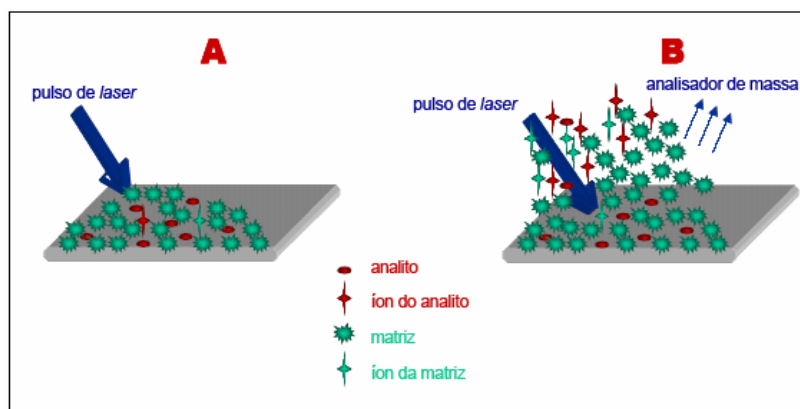


Figura 5. Representação esquemática da ionização promovida por MALDI (Cunha, 2003).

Outra das técnicas é ESI do inglês *Electrospray Ionization*, a qual está baseada na formação de um *spray*, onde os íons negativos são oxidados, aumentando a população de cargas positivas. Desta forma, o solvente vai evaporando até que os íons são expelidos por fase gasosa, e daí passam através de placas carregadas, chegando ao analisador de massas (Figura 6). Emprega-se, na geração do *spray*, um gás inerte e um campo elétrico de aproximadamente 4 kV. (Siuzdak, 1996; Palma *et al.* 2007).

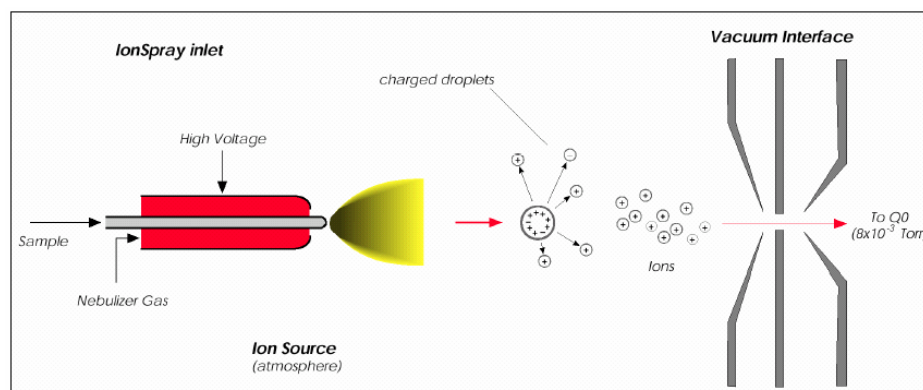


Figura 6. Representação esquemática da ionização promovida por ESI (Cunha, 2003).

## 1.8. ANÁLISE PROTEÔMICA DAS PEÇONHAS DE ESCORPIÕES

A primeira abordagem proteômica aplicada ao estudo de peçonhas de escorpiões foi realizada com a peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* com o propósito de identificar novos compostos farmacologicamente ativos nesta peçonha. A amostra foi previamente fracionada por filtração em gel e as frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF e por LC/ESI-MS, tendo sido identificadas várias toxinas, principalmente nos intervalos de massas moleculares de 6500-7500 Da, que corresponde a toxinas de cadeia longa provavelmente moduladoras de canais para  $\text{Na}^+$  voltagem-dependentes, e 2500-5000 Da que corresponde a toxinas de cadeia curta que agem em canais para  $\text{K}^+$  (Pimenta *et al.*, 2001)

No caso do escorpião amazônico *Tityus cambridgei* foram obtidas 60 frações após cromatografia por RP-HPLC tendo sido analisadas por ESI-MS e MALDI-TOF/MS, obtendo-se 102 diferentes componentes moleculares. Nesse

mesmo estudo, foi isolado um novo peptídeo, denominado Tc48a, com 65 resíduos de aminoácidos e ação sobre canais para Na<sup>+</sup> (Batista *et al.*, 2004).

No caso do escorpião brasileiro *Tityus costatus*, 50 diferentes frações foram obtidas por RP-HPLC e aproximadamente 90 diferentes compostos foram identificados por meio de LC/ESI-MS/MS. Quatro novos peptídeos foram isolados e caracterizados: 1) butantoxina que age nos canais para K<sup>+</sup> tipo *Shaker*; 2) uma toxina inseto-específica; 3) um peptídeo *scorpine-like* e 4) um pequeno heptapeptídeo com atividade desconhecida (Diego-García *et al.*, 2005)

Nascimento *et al.* (2006) propuseram um novo método para o estudo das relações filogenéticas de espécies de escorpiões da família Buthidae. Analisando a peçonha bruta de algumas espécies desta família que representam casos complexos em termos taxonômicos e de relações filogenéticas, como *Tityus stigmurus*, *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Leirus quinquestriatus quinquestriatus* e *Leirus quinquestriatus hebraeus*. Tal análise foi realizada empregando-se a técnica de 2D-LC/MS e os diferentes componentes moleculares identificados foram agrupados de acordo a sua propriedades físico-químicas (massa molecular e hidrofobicidade). Os resultados obtidos confirmam a taxonomia clássica na qual *T. serrulatus* e *T. stigmurus* são consideradas espécies muito relacionadas, *T. bahiensis* é a menos relacionada dentro do gênero *Tityus* e *L. q. quinquestriatus* e *L. q. hebraeus* apresentam pequenas diferenças que confirmam a divisão em sub-espécies. Nesta pesquisa, foram encontradas 2413 componentes com massas moleculares distintas, 632 de *T. stigmurus*, 383 de *T. serrulatus*, 464 de *T. bahiensis*, 554 de *L. q. hebraeus* e 380 de *L. q. quinquestriatus*.

Batista *et al.* (2006) realizaram o primeiro estudo proteômico com a peçonha do escorpião venezuelano *Tityus discrepans*. Por meio do fracionamento da peçonha bruta por RP-HPLC foram obtidas 58 frações e identificados 205 componentes moleculares por meio de análise por nano-ESI/MS e MALDI-TOF/MS. Tal peçonha apresenta componentes moleculares com massas moleculares de 272 a 57.908 u. m.a. Além disto, foram caracterizadas duas novas toxinas, TdK2 e TdK3, a primeira delas com 34 resíduos de aminoácidos e segunda com 36 aminoácidos, sendo que as duas toxinas apresentam atividade sobre canais para K<sup>+</sup>.



Barona *et al.* (2006) realizaram análise proteômica da peçonha do escorpião colombiano *Tityus pachyurus* e isolaram 77 frações por RP-HPLC, tendo sido detectados 104 componentes com massas moleculares distintas por espectrometria de massa tipo ESI. Também foram isolados e caracterizados dois novos peptídeos que afetam canais voltagem-dependentes: Tpa1 com 23 resíduos de aminoácidos agindo em canais para K<sup>+</sup> e Tpa2 com 65 resíduos de aminoácidos modulador de canais para Na<sup>+</sup>.

A peçonha do escorpião brasileiro *Tityus stigmurus* foi fracionada por RP-HPLC e seus componentes moleculares foram identificados empregando-se um espectrômetro de massa *ion trap-ESI*. 100 diferentes compostos foram detectados com massas moleculares indo de 216,5 até 44.800,0 Da. Quatro novos peptídeos foram isolados e caracterizados: Tst-3 similar a toxinas escorpiônicas que agem em canais para Na<sup>+</sup>, Tst-17 similar a Tc1 que tem efeito nos canais para K<sup>+</sup>, TstβKTx com seqüência idêntica à TsTx-Kβ e um peptídeo rico em prolina, mas com função desconhecida. Além disso, também seqüenciaram parcialmente duas enzimas: uma hialuronidase com massa molecular de 44.800,0 Da e uma lisozima (Batista *et al.*, 2007).

## **1.9. APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DAS TOXINAS ESCORPIÔNICAS**

Em princípio, é difícil acreditar que toxinas tenham alguma aplicação benéfica, uma vez que tal denominação indica perigo. No entanto, diferentemente do senso comum e com os avanços na área de toxinologia, tem sido identificado um grande número de substâncias com aplicações farmacológicas e biotecnológicas. É importante ter em mente que os venenos e as peçonhas de origem animais são uma fabulosa fonte de compostos bioativos e que, até o momento, apenas 1% destas moléculas foram bem caracterizadas (Ménez *et al.*, 2006). Muitos venenos e seus compostos têm sido utilizados em pesquisas biomédicas, no desenvolvimento de novas ferramentas empregadas no diagnóstico de doenças, medicamentos terapêuticos e biopesticidas (Lewis e Garcia, 2003; Editorial Toxicon, 2006).

Uma das mais importantes contribuições das toxinas escorpiônicas está relacionada aos estudos de cinética de ativação e inativação, bem como

estrutura-função dos canais voltagem-dependentes das membranas celulares, visto que tais toxinas são capazes de discriminar entre as diferentes classes de canais iônicos presentes em vertebrados e invertebrados (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2004; Bosmans e Tytgat, 2007).

Também são relevantes os estudos empregando-se toxinas inseto-específicas na elaboração de biopesticidas (Bosmans e Tytgat, 2007) e as descobertas de peptídeos antimicrobianos nas peçonhas de escorpiões, como a hadrurina isolada da peçonha do escorpião *Hadrurus aztecus*, que inibe o crescimento de bactérias como *Salmonella thyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens* (Torres-Larois *et al.*, 2000), parabutoporina, isolada de *Parabuthus schlechteri* e opistoporinas de *Opisthophthalmus carinatus* que, além de inibir o crescimento bacteriano, promovem aumento nos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular (Moeman *et al.*, 2003).

Algumas pesquisas têm demonstrado a atividade anticonvulsivante de peptídeos isolados de escorpiões, como CII9 de *Centruroides limpidus limpidus* (Corona *et al.*, 2003) e BmK-AEP de *Buthus martensi* (Jun *et al.*, 2000).

## 2. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA

Os casos de escorpionismo são observados em todos os continentes, com exceção das regiões polares. Na América Latina são mais freqüentes, principalmente, no México e Brasil, mas também são registrados casos em outras regiões da América Central e do Sul (Valderrama, 1998). Na Colômbia e, em especial no Departamento do Cauca, o escorpionismo é subestimado, uma vez que a notificação obrigatória não é exigida. A picada de escorpião é uma ocorrência habitual na Colômbia e, infelizmente, em virtude do atendimento inadequado, devido principalmente à falta de informações acerca da atividade farmacológica da peçonha das espécies comumente encontradas na região, tem sido observadas conseqüências graves, como a morte de algumas pessoas afetadas, principalmente crianças (Pineda e Castellanos, 1998; Otero, 1998).

Os estudos envolvendo espécies de escorpiões encontrados na Colômbia são ainda insipientes, sendo de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas com tais espécies. Os estudos bioquímico-farmacológicos envolvendo os componentes das peçonhas dos escorpiões encontrados na Colômbia ainda são poucos e as exceções são representadas pelos trabalhos realizados por Barona *et al.* (2006) com a peçonha do escorpião *Tityus pachyurus* e o fracionamento e a caracterização preliminar da peçonha de *C. margaritatus* realizado por Guerrero-Vargas (2002). Por estas razões é importante dar continuidade aos trabalhos iniciados com a peçonha de *C. margaritatus* e contribuir com o desenvolvimento da toxinologia na Colômbia. Além disso, o conhecimento acerca das propriedades farmacológicas das peçonhas dos escorpiões colombianos servirá de base para permitir a elaboração de um soro anti-escorpiônico eficiente contra as espécies típicas da região, hoje ainda inexistente na Colômbia.

A pesquisa com as peçonhas de escorpiões é muito importante também por seu potencial biotecnológico e farmacológico como fonte de substâncias úteis ao homem, tal como constatado nos trabalhos de Torres-Larious *et al.* (2000) e Corzo *et al.* (2001) que encontraram peptídeos antimicrobianos nas peçonhas dos escorpiões *Hadrus azectus* e *Pandinus imperator*, respectivamente.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

- Realizar análise proteômica da peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus* da região do Vale do Rio Patía, Colômbia.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Fracionar os componentes peptídicos da peçonha, mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa C<sub>8</sub> (Vydac 208TP54).
- Proceder análise das frações cromatográficas obtidas por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF.
- Determinar a estrutura primária das principais frações identificadas no presente estudo por meio de seqüenciamento químico (degradação de Edman).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. COLETA DOS ESCORPIÕES**

Os escorpiões foram coletados na região do Vale do rio Patía no Estado do Cauca, Colômbia. A coleta dos animais foi realizada entre às 17:00 e às 22:00 horas utilizando-se lâmpada de luz UV.

### **4.2. MANUTENÇÃO DOS ESCORPIÕES EM CATIVEIRO**

Os escorpiões coletados foram mantidos em cativeiro no Centro de Investigações Biomédicas - CIBUC - da Universidade do Cauca, em terrários de vidro em micro-habitats similares ao naturais. Os animais tiveram acesso a água fresca e foram alimentados a cada três dias com outros aracnídeos e insetos.

### **4.3. DETERMINAÇÃO TAXONÔMICA**

Três escorpiões machos e três fêmeas foram sacrificados para a realização da correta determinação taxonômica. Os animais foram fixados e conservados segundo normas bem estabelecidas e os espécimes foram depositados na coleção de referência de Aracnídeos do Museu de História Natural da Universidade do Cauca. Para a correta identificação taxonômica foram utilizadas chaves taxonômicas como as elaboradas por Stahnke e Calos (1977), Sisson (1990), González-Sponga (1996) e Flórez (2000).

### **4.4. OBTENÇÃO DA PEÇONHA BRUTA**

A peçonha bruta foi obtida por meio de estimulação elétrica moderada de 50 (cinquenta) escorpiões. O material obtido foi armazenado em tubos tipo *ependorf*, liofilizado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **4.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

A dosagem de proteínas foi realizada segundo o método de Lowry (Lowry, 1951) e albumina sérica bovina foi usada para a confecção da curva de calibração.

#### **4.6. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA BRUTA**

A peçonha bruta (5 mg) foi dissolvida em 250 µL de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e submetida à centrifugação por 15 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de fase reversa C<sub>8</sub> (Vydac 208TP54, 4,6 x 250 mm) previamente equilibrada em TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q, com fluxo de 1 mL/min e detecção em 215 nm. A eluição foi realizada aplicando-se um gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila.

#### **4.7. ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**

As frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha bruta em coluna C<sub>8</sub> foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (Autoflex II, Bruker), empregando-se como matriz HCCA 20 µg/µL. De cada fração cromatográfica obtida foi reservada uma alíquota de 20 µL a ser secada em Speed-Vac e cada amostra foi, então, reconstituída com 5 µL de TFA 0.1% (v/v) em água Milli-Q. Alíquotas de 2 µL desse material foi misturado com 2 µL de matriz HCCA diretamente nos poços da placa de aço inoxidável. As amostras foram secadas ao ar livre e, em seguida, analisadas no espectrômetro.

#### **4.8. OBTENÇÃO DE TOXINAS PURAS**

As frações de maior interesse foram isoladas empregando-se colunas com maior poder de resolução, C<sub>18</sub> de 4,6 x 250 mm e 2,1 x 250 mm (Vydac TP54)

#### **4.9. REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO**

As toxinas purificadas por RP-HPLC foram dissolvidas em 100 µL de tampão desnaturante (cloridato de guanidina 6,0 M, Tris-HCl 0,3 M pH 8,6) adicionado de DTT (na proporção 1,5 mg de DTT para 1,0 mL de tampão desnaturante). As amostras ficaram incubadas sob agitação constante de 400 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) durante 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após esse período, 2 µL de 4-vinilpiridina foram adicionados sob atmosfera de nitrogênio. As toxinas foram novamente incubadas a 37°C, sob agitação constante de 400 rpm, durante 1h.

Em seguida, cada fração foi dessalinizada utilizando-se coluna de fase reversa C<sub>4</sub> (Vydac C<sub>4</sub> 214TP54) em sistema de HPLC. A coluna foi equilibrada previamente com TFA 0,1% (v/v) e a eluição ocorreu devido à utilização de um gradiente linear de acetonitrila com TFA a 0,1% (v/v), com fluxo de 0,8 mL/min e detecção em 216 nm.

#### **4.10. SEQÜENCIAMENTO QUÍMICO N-TERMINAL**

As toxinas purificadas foram submetidas a seqüenciamento químico por meio da degradação de Edman em um seqüenciador automático de proteínas modelo 477A da Applied Biosystems modificado por Fontes *et al.*, 1998.

#### **4.11. ANÁLISES COMPUTACIONAIS**

A partir das seqüências obtidas, procedeu-se análises computacionais objetivando-se determinar o grau de similaridade com famílias de toxinas já descritas na literatura. Para o cumprimento deste objetivo foi utilizado o programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) disponível no sítio: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. A busca foi feita no banco de dados “nr” (não-redundante) e o parâmetro utilizado foi o próprio *default* (padrão) do BLAST.

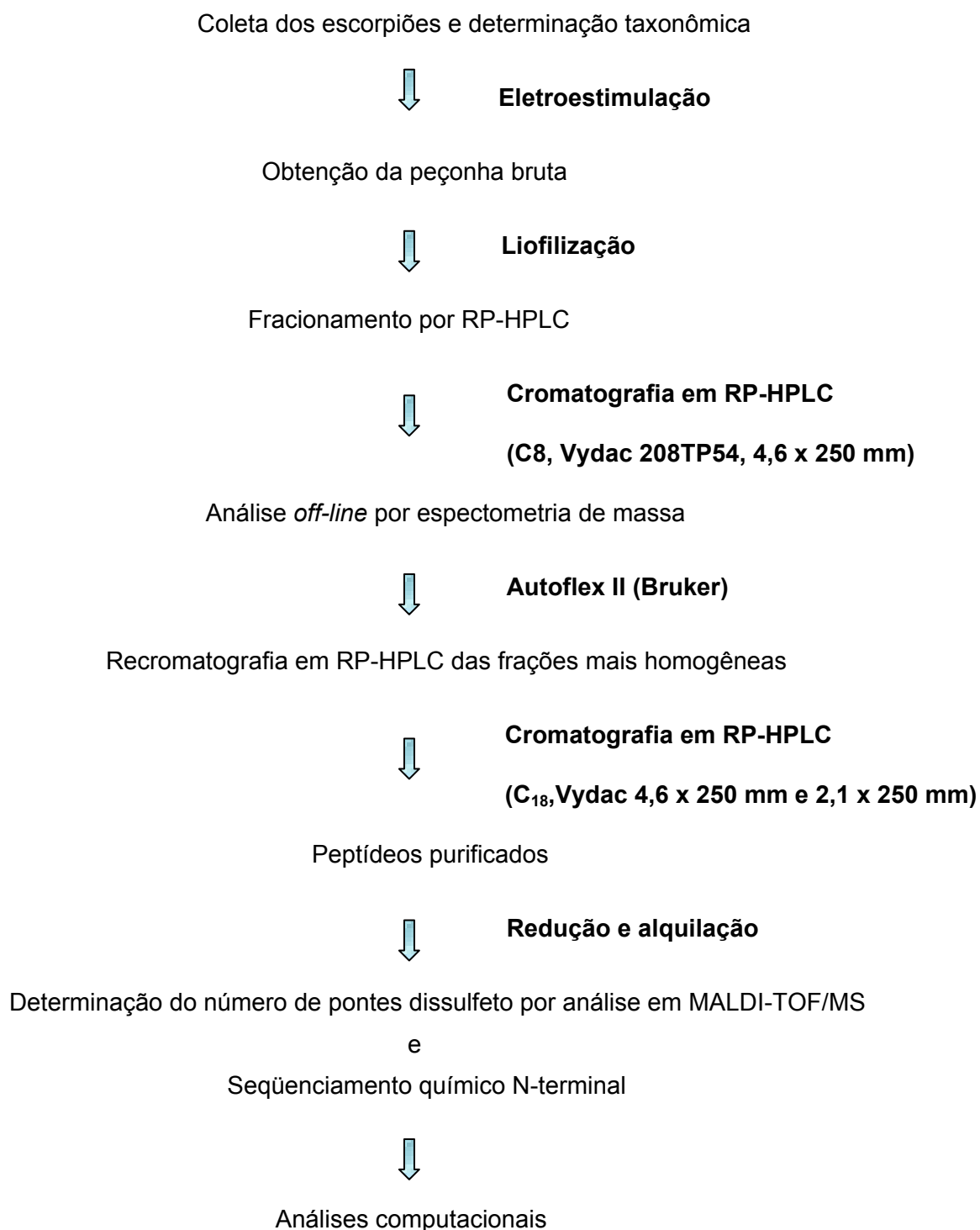


Figura 7. Esquema geral da estratégia experimental empregada no isolamento e caracterização de peptídeos bioativos presentes na peçonha de *C. margaritatus*.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente projeto de pesquisa aprofundou os estudos relacionados com a caracterização bioquímica dos componentes de natureza peptídica presentes na peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus* coletado na região do vale do rio Patía, no estado do Cauca, Colômbia, visto que, até o momento, os estudos envolvendo tal espécie são bastante limitados.

A estratégia experimental adotada envolveu o fracionamento da peçonha bruta por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em colunas de fase reversa C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> associada à caracterização peptidômica de todas as frações eluídas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. Além disso, foi possível a purificação e determinação da estrutura primária de dois novos peptídeos isolados da peçonha de *C. margaritatus*.

### 5.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Os escorpiões utilizados neste estudo foram coletados na região do Vale do Patía, estado do Cauca, Colômbia, exatamente entre os povoados de Patía e do Estrecho, localizados a 75 km ao sul da cidade de Popayán e a uma altitude de 600 m do nível do mar (Figura 8).

Este vale possui, em termos gerais, um clima ameno e seco, apresentando variações regionais em seus índices pluviométricos, tendo áreas muito áridas e outras muito chuvosas. A temperatura média anual é de 28,1°C, registrando-se máximas absolutas de até 38,5°C nos meses de agosto e setembro. O índice pluviométrico diminui em direção ao sul e aumenta ao norte alcançando valores de 2000 mm.

A vegetação natural da região tem sofrido um dramático processo de devastação e, atualmente, é representada por pequenos bosques localizados nas margens dos rios e riachos, predominando, dentre as espécies vegetais, as ceibas (*Ceiba pentandra*) e os samanes (*Samanea saman*). O bosque é constituído por arbustos espinhosos tipicamente xerofíticos (Torres *et al.*, 1992).

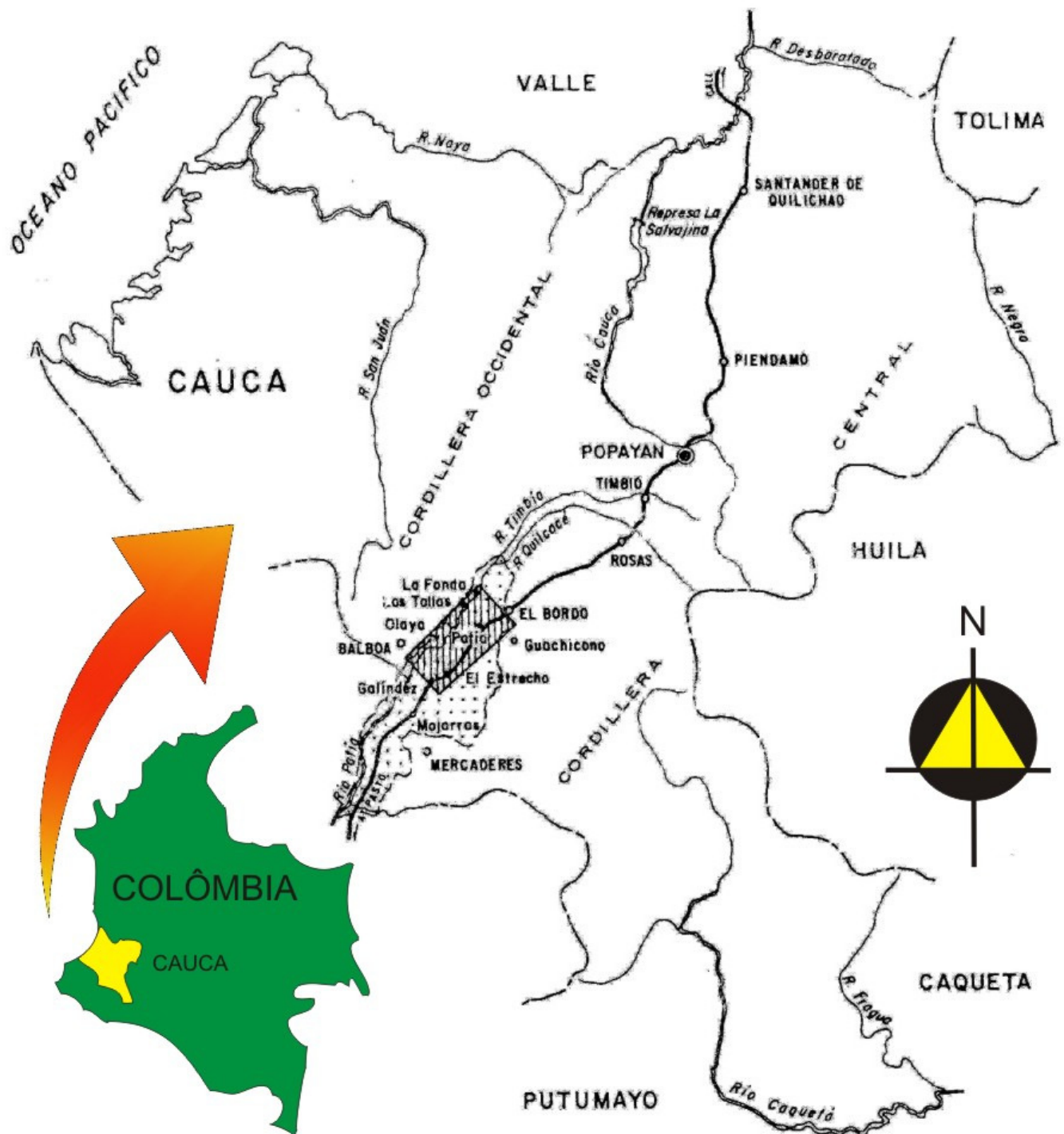


Figura 8. Mapa da área de estudo, Bacia do rio Patía, Estado do Cauca, Colômbia (Torres et al., 1992).

O tipo fisionômico corresponde a um bosque seco de terras baixas segundo Holdridge (1985) e tais condições climáticas são ideais para a proliferação de

escorpiões da espécie *C. margaritatus*.

## 5.2 COLETA DE ESCORPIÕES

As saídas de campo para a coleta de escorpiões foram realizadas em março e dezembro de 2006 e em janeiro de 2007. A procura foi feita em troncos secos e embaixo de pedras tanto no horário diurno quanto noturno (Figura 9).

Uma amostra de 136 escorpiões adultos (80 fêmeas e 56 machos) da espécie *C. margaritatus* foi coletada e mantida em cativeiro.



Figura 9. (A). Coleta de escorpiões durante o dia. (B). Coleta noturna de escorpiões com o emprego de lâmpada de luz UV. (C). Manutenção em terrários.

O trabalho do campo relacionado com a coleta dos espécimes constitui uma fase de grande importância nos estudos toxicológicos e requer dedicação e responsabilidade, a fim de não correr riscos desnecessários, não maltratar os

animais, bem como, garantir um número de indivíduos adequado à execução das etapas originalmente propostas. Tal etapa foi concluída com sucesso, tendo sido realizadas coletas diurnas e noturnas, sempre empregados métodos adequados aos objetivos propostos (Sisson, 1990).

### 5.3 DETERMINAÇÃO TAXONÓMICA

Três escorpiões adultos machos e três fêmeas foram eutanasiados e fixados em etanol seguindo os protocolos internacionais de coleções biológicas de referência. Por meio do emprego das chaves taxonômicas de Stahnke e Calos (1977), Sisso (1990) e González-Sponga (1996) foi possível obter-se a confirmação de tratarem-se de indivíduos da espécie *Centruroides margaritatus*.

Tal espécie apresenta tamanho médio a grande, alcançando facilmente 11 cm de comprimento. Sua coloração é variável, sendo as pinças, assim como os segmentos terminais da cauda, mais escuras, enquanto o resto do corpo apresenta coloração café escuro a preto; as patas são amarelo-claro e o resto do corpo tem uma cor amarelo-escuro. Os machos são mais magros que as fêmeas. Esta é a espécie de butídeo que apresenta as carianas (linha de grânulos nos dedos das pinças e da cauda) melhor definidas e de fácil distinção e também caracteriza-se por ser uma espécie muito agressiva (Viquez, 2000).

Outro aspecto importante, diretamente relacionado com a qualidade dos resultados obtidos, diz respeito à correta determinação taxonômica da espécie peçonhenta em estudo, visto que a Toxinologia é um campo de estudo interdisciplinar, que depende de aportes importantes das ciências básicas como taxonomia, sistemática, etologia, ecologia, fisiologia, bioquímica e das ciências aplicadas como a biotecnologia e a farmacologia. (Figura 10).

Entretanto, na Colômbia, existe apenas o registro de ocorrência da espécie *Centruroides gracilis* (Flórez, 2001 e 2007). Neste trabalho, foi conservado o epíteto *margaritatus* visto que tal determinação taxonômica foi corroborada pelo prestigioso aracnologista e taxonomista venezuelano Manuel Gonzáles Sponga.

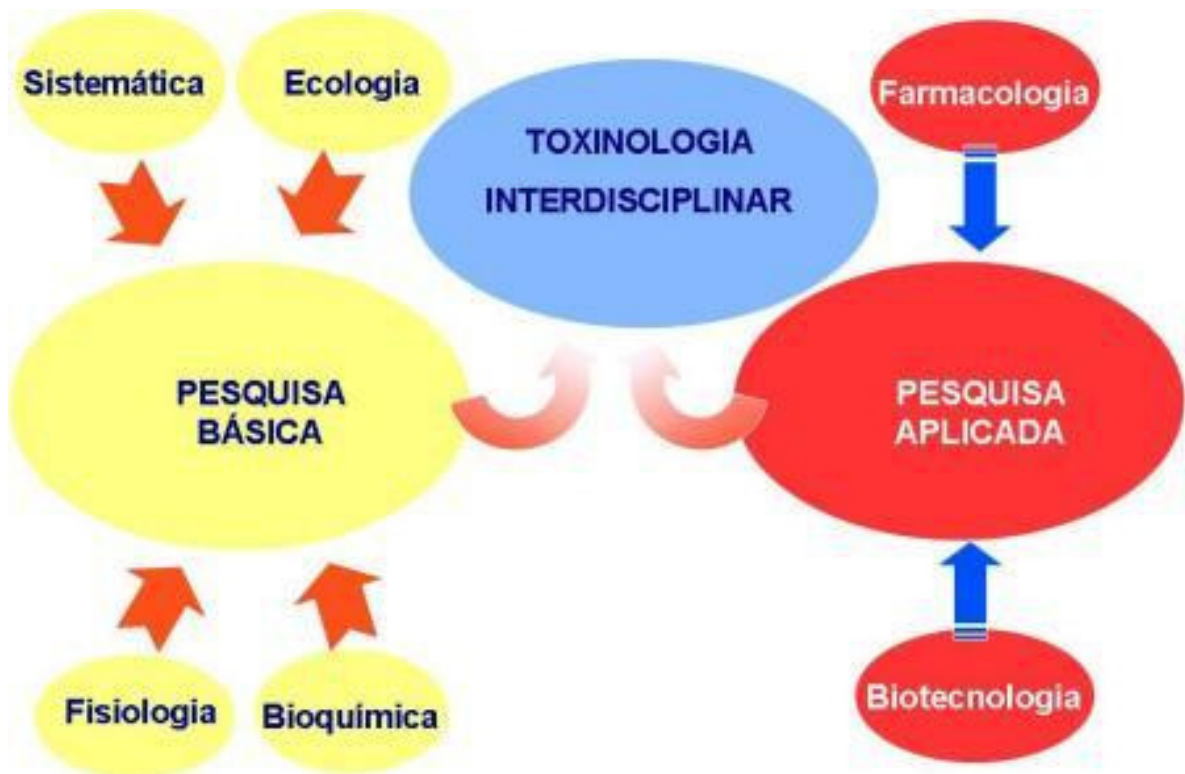


Figura 10. Representação esquemática das relações entre a Toxinologia e as ciências básica e aplicada.

#### 5.4 OBTENÇÃO DA PEÇONHA BRUTA

A peçonha bruta foi obtida por meio da estimulação elétrica (Figura 11) de 130 indivíduos adultos. Cada escorpião foi imobilizado e, com o emprego de pinças, o télson foi introduzido na abertura de um tubo tipo *ependorf*. Em seguida, foram aplicados os estímulos elétricos no quarto segmento abdominal.



Figura 11. Extração da peçonha bruta de *C. margaritatus* por estimulação elétrica.

Para a obtenção da peçonha bruta, existem três métodos diferentes atualmente descritos: amputação do telson e sua trituração e maceração com água ou solução salina; estimulação física manual do prossoma e, por fim, a estimulação elétrica (Sissom, 1990; Barona *et al.*, 2004) O primeiro método tem a desvantagem da contaminação da peçonha com resíduos celulares. O segundo método garante uma boa quantidade de peçonha, mas tem a desvantagem de que é um procedimento lento e trabalhoso. A estimulação elétrica é o método mais utilizado, mas apresenta como desvantagem a fadiga muscular frente à estimulação elétrica, levando a uma interrupção na liberação da peçonha. Por outro lado, tem a grande vantagem de manter a integridade física dos animais (Sissom, 1990).

Padronizou-se a extração da peçonha da seguinte maneira: foram aplicados 5 estímulos de 50 V cada um por animal e à medida que a peçonha foi liberada, as gotas de peçonha que entravam no tubo foram contadas. Os dados padronizados estão apresentados na Tabela 1.

Ao final, foram obtidos três *pools* contendo a peçonha bruta, denominados CM<sub>1</sub>, CM<sub>2</sub> e CM<sub>3</sub>. Para cada uma dessas amostras foi estimada a concentração de proteínas empregando-se a relação de Lambert-Beer (D'Suze *et al.*, 1996)

$$C_{fv} = (A_{280}) (Fd) (Vt)$$

Onde:

C<sub>fv</sub> = Concentração final do *pool* de peçonha em mg/mL

A<sub>280</sub> = Absorbância a 280 nm

Fd = Fator de diluição

Vt = Volume total do *pool*

As concentrações obtidas foram 78,137 mg/mL; 67,158 mg/mL e 20,828 mg/mL para os tubos CM<sub>1</sub>, CM<sub>2</sub> e CM<sub>3</sub>, respectivamente. Na extração da peçonha, também foi possível observar uma diferença na produção de peçonha entre machos e fêmeas e também que as fêmeas grávidas produzem menos peçonha que as fêmeas não-grávidas (Tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 1. Padronização da extração da peçonha de *C. margaritatus*.

Indivíduo	Número de gotas de peçonha obtido	Sexo
1	3	F
2	5	F
3	0	F*
4	5	F
5	5	F
6	2	F
7	4	M
8	5	F
9	3	F
10	5	F
11	5	F
12	5	F
13	5	F
14	3	M
15	3	F
16	1	F
17	5	F
18	4	M
19	3	F
20	4	F
21	0	F*
22	3	F
23	4	F
24	5	F
25	4	F
26	4	F
27	2	M
28	3	M

F\*. Fêmea grávida

Para analisar melhor tal diferença foram coletadas 3 amostras de 38 indivíduos cada uma, uma de machos e duas de fêmeas, estas últimas com fêmeas não-grávidas, fêmeas com gravidez inicial, fêmeas com gravidez intermediária e fêmeas com gravidez avançada. Tais *pools* de peçonha foram denominados CM<sub>4</sub> para os machos, CM<sub>5</sub> e CM<sub>6</sub> para as fêmeas e a concentração de material protéico foi estimada como sendo: CM<sub>4</sub>, 13,615 mg/mL, CM<sub>5</sub>, 14,774 mg/mL e CM<sub>6</sub>, 26,613 mg/mL.



Tabela 2. Comparação da produção de peçonha (número de gotas obtidas após estimulação elétrica) entre machos e fêmeas de *C. margaritatus*.

CM <sub>4</sub>			CM <sub>5</sub>			CM <sub>6</sub>		
Indivíduo	Número de gotas de peçonha obtido	Sexo	Indivíduo	Número de gotas de peçonha obtido	Sexo	Indivíduo	Número de gotas de peçonha obtido	Sexo
1	0	♂	1	5	♀	1	5	♀
2	5	♂	2	5	♀	2	4	♀
3	5	♂	3	5	♀	3	4	♀
4	5	♂	4	0	♀***	4	5	♀
5	5	♂	5	4	♀	5	4	♀
6	5	♂	6	2	♀**	6	5	♀
7	5	♂	7	5	♀	7	0	♀***
8	4	♂	8	5	♀	8	5	♀*
9	4	♂	9	5	♀	9	5	♀*
10	5	♂	10	5	♀	10	1	♀***
11	5	♂	11	0	♀	11	5	♀
12	5	♂	12	5	♀	12	0	♀***
13	5	♂	13	5	♀	13	5	♀*
14	5	♂	14	4	♀	14	5	♀
15	5	♂	15	4	♀	15	5	♀
16	5	♂	16	4	♀	16	5	♀
17	4	♂	17	5	♀*	17	5	♀
18	5	♂	18	4	♀	18	4	♀
19	4	♂	19	3	♀**	19	3	♀
20	3	♂	20	5	♀	20	5	♀
21	4	♂	21	5	♀*	21	5	♀*
22	3	♂	22	5	♀	22	0	♀***
23	4	♂	23	5	♀	23	0	♀***
24	4	♂	24	5	♀	24	5	♀
25	4	♂	25	4	♀	25	5	♀
26	4	♂	26	0	♀***	26	5	♀
27	5	♂	27	4	♀*	27	5	♀
28	4	♂	28	0	♀***	28	5	♀*
29	0	♂	29	0	♀***	29	4	♀
30	5	♂	30	5	♀*	30	5	♀
31	5	♂	31	5	♀*	31	5	♀
32	3	♂	32	4	♀	32	0	♀***
33	5	♂	33	4	♀	33	5	♀
34	4	♂	34	5	♀*	34	4	♀**
35	3	♂	35	5	♀*	35	4	♀**
36	4	♂	36	5	♀*	36	0	♀***
37	4	♂	37	5	♀*	37	5	♀
38	4	♂	38	0	♀***	38	4	♀**

♀\* Fêmea com gravidez inicial

♀\*\* Fêmea com gravidez intermediária

♀\*\*\* Fêmea com gravidez avançada

Para avaliar se a gravidez interfere com a produção de peçonha, foi aplicado o teste do Qui-Quadrado. O teste do Qui Quadrado, simbolizado por  $X^2$ , é um teste de hipóteses que se destina a encontrar um valor da dispersão para duas variáveis nominais, avaliando a associação existente entre variáveis qualitativas. Trata-se de um teste não-paramétrico, que pode ser usado para determinar a significância de diferenças entre dois grupos independentes (Siegal e Castellan, 2006). Para este caso em particular, os dados foram calculados por tabelas de contingência e, nesta prova, a hipótese nula ( $H_0$ ) assume que a quantidade de peçonha produzida é independente do estado de gravidez das fêmeas e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) diz que a quantidade de peçonha produzida pelas fêmeas depende de seu estado de gravidez.

A quantidade de peçonha produzida dependente do estado de gravidez das fêmeas (rejeição da hipótese nula  $X^2 = 55,70$  com 10 graus de liberdade e  $p < 0,005$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de peçonha em fêmeas em diferentes estágios de gravidez.

Número de gotas de peçonha obtido	Gravidez			TOTAL
	Inicial	Intermediária	Avançada	
0	0 (4,96)	0 (1,77)	11 (4,25)	<b>11</b>
1	0 (0,45)	0 (0,16)	1 (0,39)	<b>1</b>
2	0 (0,45)	1 (0,16)	0 (0,39)	<b>1</b>
3	0 (0,45)	1 (0,16)	0 (0,39)	<b>1</b>
4	1 (1,81)	3 (0,65)	0 (1,54)	<b>4</b>
5	13 (5,87)	0 (2,10)	0 (5,03)	<b>13</b>
<b>TOTAL</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	<b>31</b>

Com relação à obtenção da peçonha bruta, os dados obtidos foram interessantes e demonstraram diferenças na produção de peçonha (em mg/mL de proteína) entre machos e fêmeas. Tais resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram diferenças entre as peçonhas de indivíduos de uma mesma espécie, como no caso de *Opisthacanthus madagascariensis*, do qual foi isolado e caracterizado um peptídeo, denominado IsTX, com potente efeito neurotóxico sobre canais para potássio, que só está presente nos machos dessa espécie (Yamaji *et al.*, 2004). Foi observada diferença na produção de peçonha entre adultos e jovens de *C. margaritatus*, tendo sido encontrada uma maior concentração

de proteínas na peçonha dos indivíduos jovens (Guerrero *et al.*, 2006). Estudos eletroforéticos realizados com a peçonha de duas populações do escorpião *Mesobuthus tamulus* revelou variação intraespecífica, indicando diferenças no grau de toxicidade da peçonha das duas populações (Badher *et al.*, 2006).

Outro aspecto importante observado no presente estudo foi a variação encontrada na produção de peçonha entre fêmeas dependendo de seu estado de gravidez, confirmando que o nível de expressão das toxinas escorpiônicas depende de diversos fatores como sexo, idade, variação genética, distribuição geográfica, etc. (Yamaji *et al.*, 2004). Estas informações devem ser consideradas na fabricação de soros anti-escorpiônicos, de modo a se garantir seu potencial neutralizante (Kankonkar *et al.*, 1998). Outro fato relacionado com a produção de peçonha é o gasto metabólico envolvido com sua síntese. Estudos comparando o aumento no gasto metabólico na regeneração da peçonha escorpiônica após de uma extração têm demonstrado que os escorpiões ordenhados apresentam um aumento de até 39% em sua taxa metabólica (Nisani *et al.*, 2007). Pode-se fazer um paralelo com a diminuição na produção de peçonha em fêmeas grávidas, uma vez que boa parte de sua capacidade metabólica está direcionada para a manutenção e conclusão da gravidez.

## **5.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY**

A dosagem de proteínas foi realizada empregando-se o método de Lowry (Lowry, 1951). O experimento foi feito em triplicata e a curva de calibração foi confeccionada empregando-se com albumina sérica bovina na concentração de 0 a 210 µg (figura 12) como padrão de referência.

A dosagem da amostra resultou em 64,22 mg de peçonha bruta liofilizada. Alíquotas de 5 mg de peçonha foram preparadas e armazenadas a -20°C.

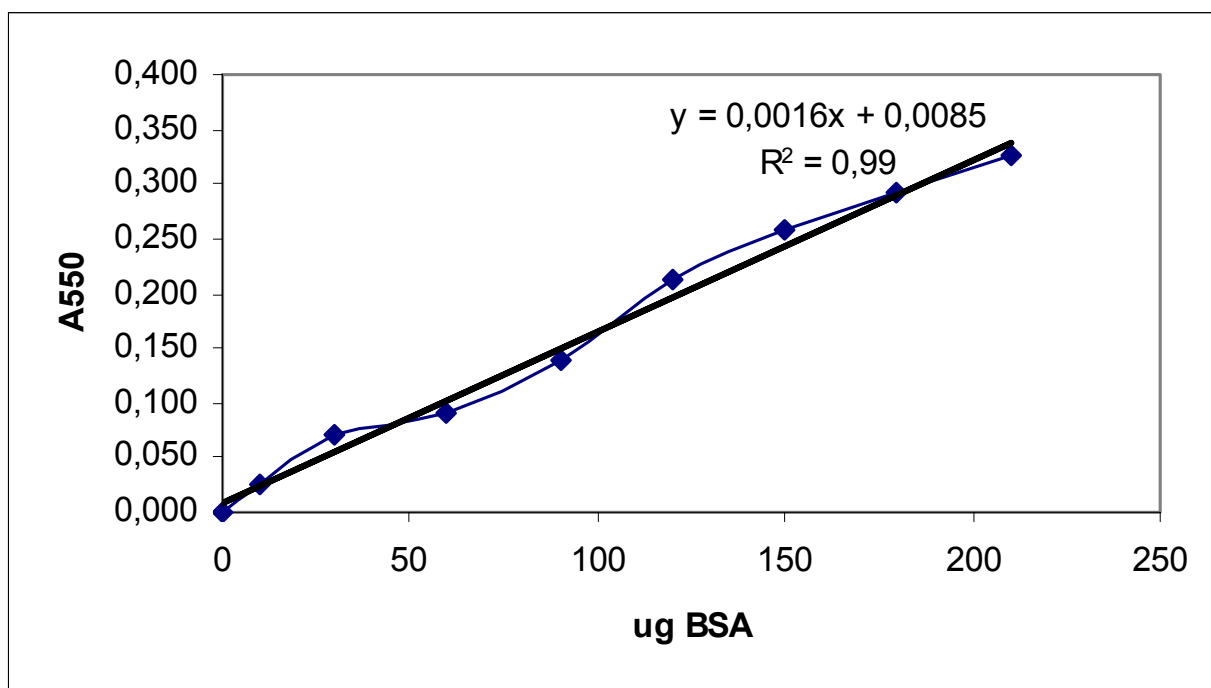


Figura 12. Dosagem de proteínas pelo método de Lowry.

## 5.6 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA PEÇONHA BRUTA

O fracionamento da peçonha bruta de *C. margaritatus* resultou em um perfil cromatográfico repetitivo com a eluição de 43 frações (Figura 13).

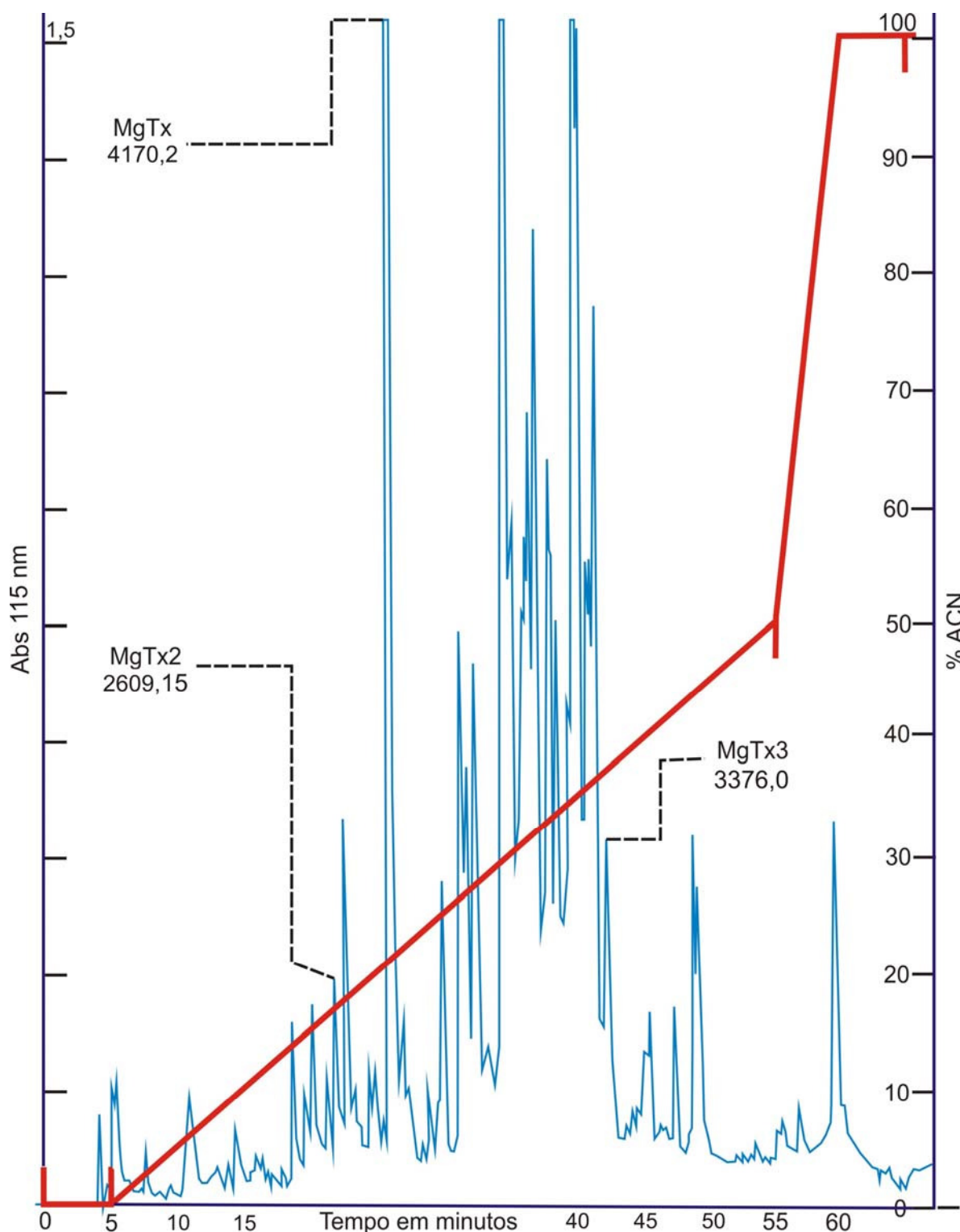


Figura 13: Perfil cromatográfico típico do fracionamento da peçonha de *C. margaritatus* em coluna de fase reversa C<sub>8</sub>. A peçonha bruta (5 mg) foi dissolvida em 250  $\mu$ L de TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e submetida à centrifugação por 15 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de fase reversa C<sub>8</sub> (Vydac 208TP54, 4,6 x 250 mm) previamente equilibrada em TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q. As frações foram eluídas com gradiente linear de TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com fluxo constante de 1,0 mL/min, monitoramento em 215 nm, sendo coletadas manualmente, liofilizadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 5.7 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Todas as frações cromatográficas obtidas foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (Autoflex II, Bruker). Cada fração foi dissolvida em TFA 0,1% (v/v) em água Milli-Q e aplicada diretamente na placa de aço inoxidável, na proporção de 1 µL da matriz ácido  $\alpha$ -hidroxicinâmico (HCCA) 10 µg/µL em acetonitrila 50% para 1 µL da amostra. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro de massa *Autoflex II* (Bruker Daltonics) usando o modo refletor positivo com aplicação de 70 pulsos de *laser*.

Tal análise resultou na caracterização proteômica da peçonha de *C. margaritatus* como exibido na Tabela 4.

A análise por espectrometria de massa resultou na detecção de 91 componentes distintos presentes na peçonha de *C. margaritatus*. Organizando tais dados experimentais em intervalos de massas moleculares de 500 Da (Figura 14), observa-se que os intervalos com maior número de componentes detectados foram de 500-1000 Da, com 19 componentes; de 3501-4000 Da com 14 componentes e de 2501-3000 Da e 4001-4500 com 11 componentes cada uma. Pode-se constatar que a peçonha de *C. margaritatus* é bastante rica, principalmente, em peptídeos dentro da faixa de massa molecular de 2.500 a 4.500 Da, região característica das toxinas moduladoras de canais para potássio (Pimenta *et al.*, 2001; García *et al.*, 2001; Favreau *et al.*, 2006) (Figura 14).

É conhecido que nas peçonhas de escorpiões, principalmente de butídeos, o intervalo de massas moleculares entre 2500-6000 Da corresponde a moléculas que apresentam atividade em canais para potássio voltagem-dependentes e na faixa entre 6001-8000 estão os peptídeos que atuam em canais para sódio voltagem-dependentes (Pimenta *et al.*, 2001; García *et al.*, 2001; Favreau *et al.*, 2006)

Tabela 4. Caracterização molecular da peçonha de *C. margaritatus*.

Fração	Tempo de retenção	Massa molecular $[M+H]^+$
Cm1	4,2	567,4 671,4 876,6
Cm2	5,9	591,9 696,2
Cm3	7,8	643,3 870,7
Cm4	11,2	568,0 854,8
Cm5	14,5	624,1 784,1 811,3
Cm6	16,2	614,3 799,2
Cm7	18,6	739,2 879,2 1080,3
Cm8	19,1	908,4 1239,3 2291,5 2389,47 2824,4 2986,4
Cm9	19,6	2541,2 2565,7 2609,3 3631,15
Cm10	20,4	2609,15
Cm11	21,2	1306,4 1468,5 2242,0 2609,4 3540,9
Cm12	22,0	1870,2 4172,7
Cm13	22,9	1509,6 3227,1 4137,9
Cm14	24,5	2114,3 2744,4
Cm15	26,4	4170,2
Cm16	27,2	2819,4 4142,2 4179,4 4194,0
Cm17	28,7	1295,6 2820,0 3985,8
Cm18	30,2	4108,8 4234,1
Cm19	31,7	2874,9 3271,3 3723,1 4740,5
Cm20	32,6	3337,1 4226,7 4788,5
Cm21	33,1	4045,2 6340,4
Cm22	33,6	6590,9
Cm23	35,4	4503,6 5609,9 6498,7 6589,7
Cm24	36,1	993,8
Cm25	36,5	854,7
Cm26	36,9	3709,4 6798,8 7394,7
Cm27	37,5	4186,2 6731,2 6970,0
Cm28	38,0	6786,1
Cm29	38,6	3744,7 5017,9 6786,4
Cm30	39,3	5989,9 6948,3
Cm31	39,7	3376,9 6934,0
Cm32	40,8	3376,0
Cm33	41,0	3360,8 3376,8 3504,6 3541,8 3647,6
Cm34	41,5	3564,6 3687,2
Cm35	41,9	3564,6 37621
Cm36	42,4	3564,3
Cm37	43,5	Não detectada
Cm38	49,1	Não detectada
Cm39	53,2	Não detectada
Cm40	55,5	Não detectada
Cm41	56,8	Não detectada
Cm42	59,5	Não detectada
Cm43	60,1	Não detectada

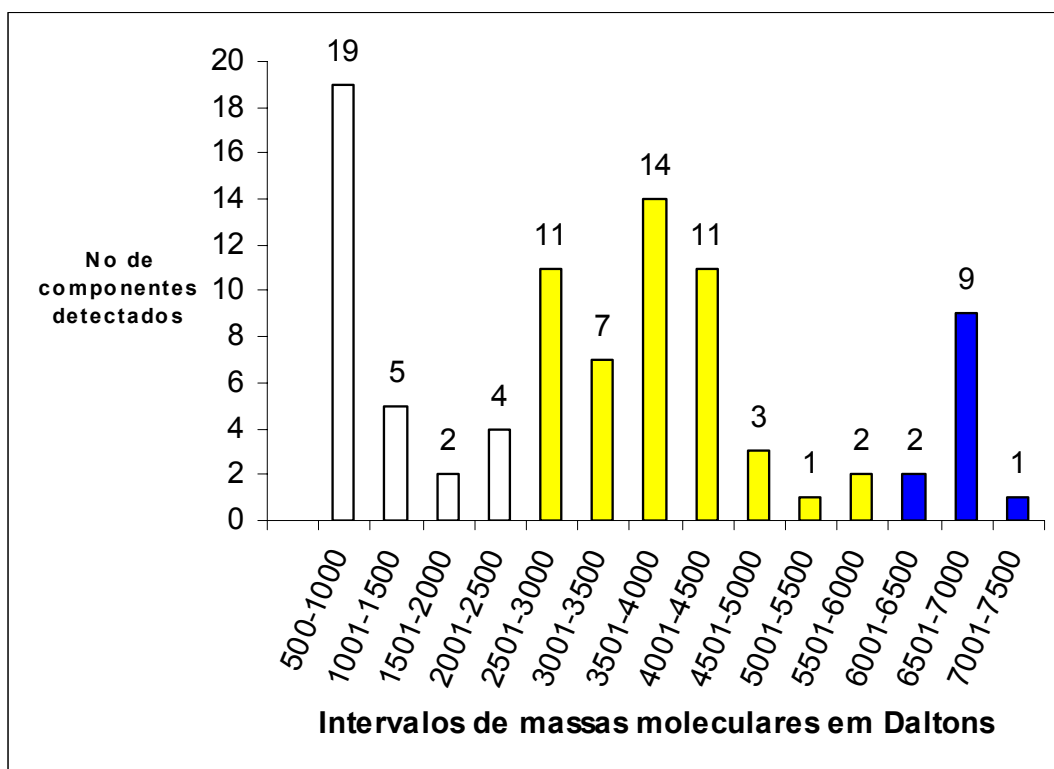


Figura 14. Intervalos de massas moleculares dos componentes presentes na peçonha de *C. margaritatus*.

Segundo observado nas Tabelas 4 e 5 e na Figura 15, a peçonha de *C. margaritatus* apresenta 54% dos seus componentes detectados como prováveis moduladores de canais para potássio voltagem-dependentes. Tais toxinas possuem cadeia curta com 25 a 40 resíduos de aminoácidos e com três ou quatro pontes dissulfeto (García *et al.*, 2001; Rodríguez de la Vega e Possani, 2004; Favreu *et al.*, 2006). São chamadas de KScTx e, segundo Tytgat *et al.* (1999), estão agrupadas em três grandes famílias:  $\alpha$ -KScTx,  $\beta$ -KScTx e  $\gamma$ -KScTx. As  $\alpha$ -KScTx é a maior família, composta por 12 subfamílias com mais de 120 peptídeos já descritos (Rodríguez de la Vega e Possani, 2004).

13% das moléculas detectadas na peçonha de *C. margaritatus* estão no intervalo de massas moleculares entre 6001-7500 Da. Dentro desse intervalo, estão os peptídeos de cadeia longa formados por 55 a 78 resíduos de aminoácidos e estabilizados por três ou quatro pontes dissulfeto. Tais peptídeos são capazes de interferir com o fluxo do íon sódio através da membrana plasmática (Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003; Favreu *et al.*, 2006). É importante ressaltar que os peptídeos que



agem nos canais para Na<sup>+</sup> são os principais responsáveis pelos mais graves efeitos neurotóxicos durante o envenenamento (De la Vega e Possani, 2005).

Tais diferenças no número de toxinas moduladoras de canais para sódio presentes em uma determinada peçonha podem refletir seu grau de toxicidade. Ao se comparar as peçonhas das espécies *C. margaritatus* e *T. pachyurus* (ambas coletadas na Colômbia), pode-se constatar diferenças significantivas em sua toxicidade: a DL<sub>50</sub> de *T. pachyurus* é 4,8 mg/kg (Barona *et al.*, 2004), enquanto que a DL<sub>50</sub> de *C. margaritatus* é 42,83 mg/kg (Guerrero *et al.*, 2006). A espécie *T. pachyurus* é muito mais tóxica que *C. margaritatus* e, em estudo realizado por Barona *et al.* (2006) relacionado com a caracterização proteômica da peçonha de *T. pachyurus*, foi observado um grande número de peptídeos no intervalo de massas moleculares que corresponde aos peptídeos que agem em canais para sódio voltagem-dependentes.

Na Figura 15, observa-se que 33% dos componentes detectados por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF presentes na peçonha de *C. margaritatus* possuem massa molecular abaixo de 2000 Da. Tal conjunto de peptídeos de baixa massa molecular ainda não foi bem estudado (Favreu *et al.*, 2006), mas as funções biológicas para alguns desses peptídeos já foram determinadas. O peptídeo tetrapandis (600 Da) é uma toxina isolada do escorpião *Pandinus imperator* que inibe os canais para cálcio (Shalabi *et al.*, 2004). A bradiginina (1604 Da), isolada de *Tityus serrulatus* (Ferreira *et al.*, 1993), ativa as células endoteliais, permitindo a vasodilatação (Moreau *et al.*, 2005). Dois peptídeos lineares básicos com estrutura anfipática em  $\alpha$ -hélice foram isolados e caracterizados do escorpião *Buthus martensii* (BmKn1, 1334,8 Da e Bmkn2, 1447,9 Da). O peptídeo BmKn2 inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Zeng *et al.*, 2004). Tem sido observado que pequenos peptídeos com massas moleculares menores a 2 kDa correspondem a versões truncadas de toxinas de cadeia longa (Pimenta *et al.*, 2001).

O presente estudo proteômico com a peçonha de *C. margaritatus* detectou 91 peptídeos dos quais 49 podem corresponder a toxinas que agem em canais para potássio e 12 que atuam em canais para sódio como indicado na Tabela 5. Tais resultados estão de acordo com outros trabalhos nos quais foram aplicadas técnicas proteômicas ao estudo da peçonha de escorpiões do gênero *Tityus*, os quais têm

relatado a ocorrência de, em média, 100 diferentes peptídeos/proteínas em cada uma dessas peçonhas (Pimenta *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2004, 2006; Diego-Garcia *et al.*, 2005; Barona *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2006). Um grande número dessas moléculas, que possuem massas moleculares compreendidas entre 2.000 e 8.000 Da, correspondem à toxinas escorpiónicas que atuam em canais voltagem-dependentes de potássio e sódio.

Tabela 5. Número de moléculas detectadas e sua possível atividade biológica.

Atividade biológica	Número de moléculas detectadas
Desconhecida	30
Moduladoras de Canais para K <sup>+</sup>	49
Moduladoras de Canais para Na <sup>+</sup>	12
<b>TOTAL</b>	<b>91</b>

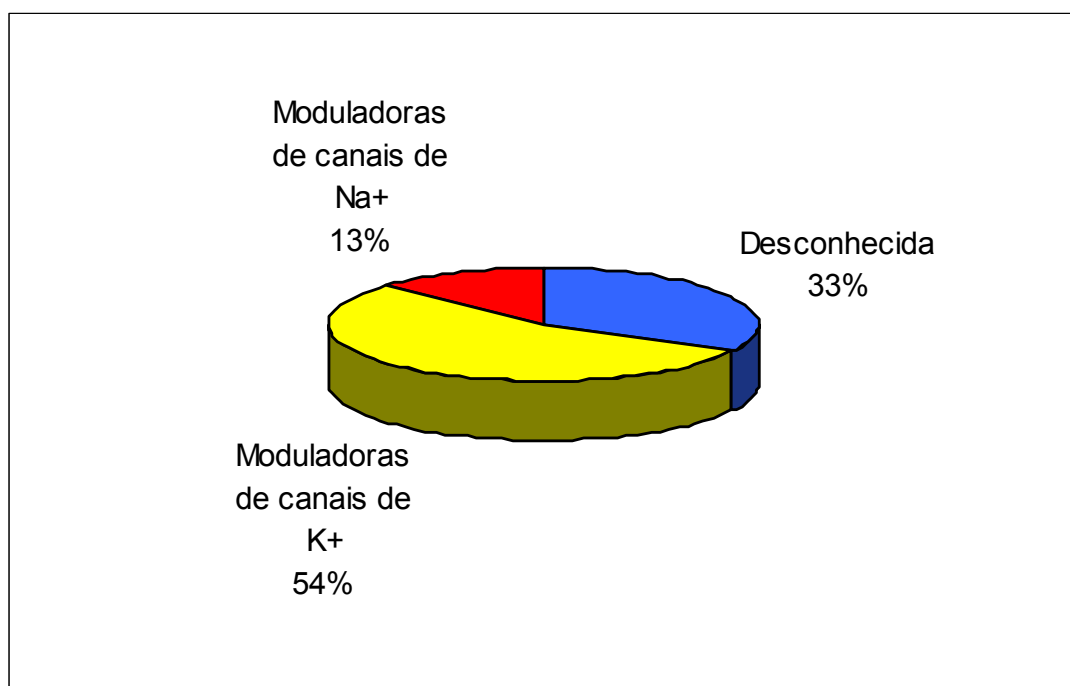


Figura 15. Porcentagem de moléculas com possível atividade biológica.

Algumas frações, em virtude do seu maior grau de homogeneidade, foram mais profundamente analisadas.

A fração Cm15 (Figura 16), com massa molecular de 4,17 kDa corresponde, provavelmente, a margatoxina (MgTx), toxina bloqueadora de canais para potássio voltagem-dependentes, previamente isolada da peçonha de *C. margaritatus* por García-Calvo *et al.* em 1993.

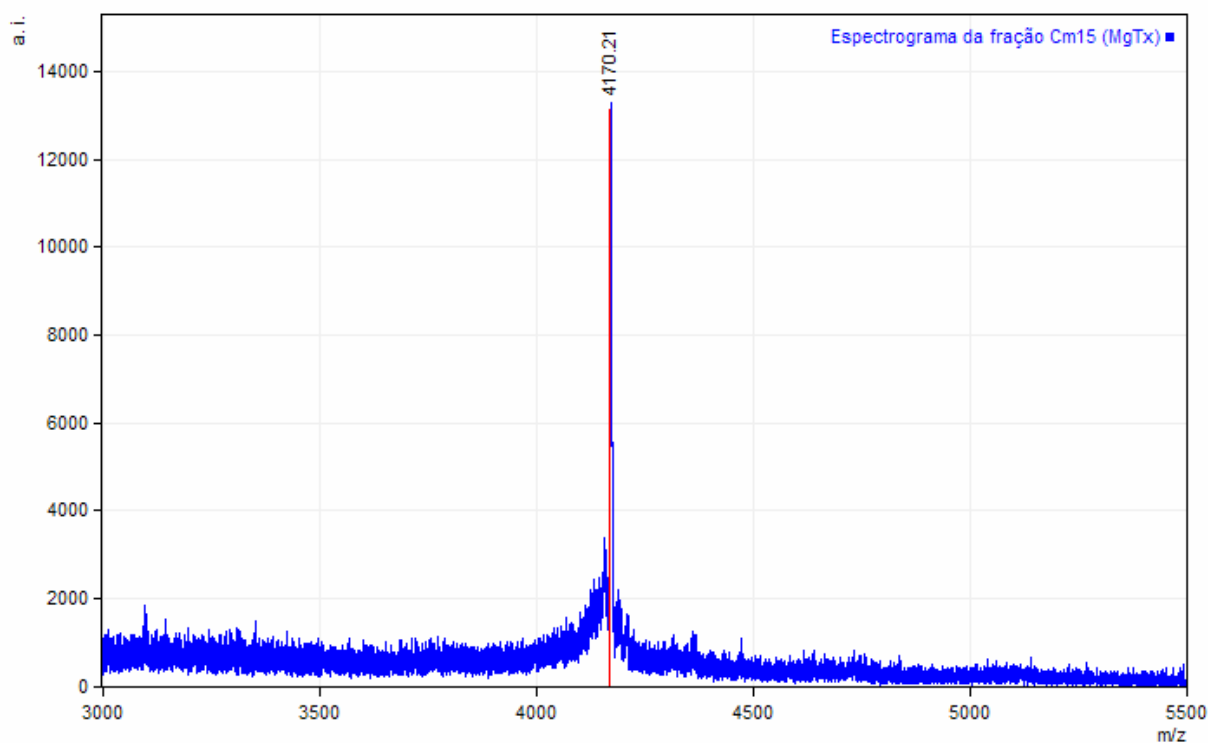


Figura 16. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina nativa.

Trata-se de um peptídeo com 39 resíduos de aminoácidos (massa molecular 4178 Da), que atua em canais para potássio voltagem-dependentes. Tal peptídeo foi isolado empregando-se dois passos cromatográficos, uma cromatografia de troca iônica seguida de uma recromatografia em coluna de fase reversa  $C_{18}$ . Diferentemente da estratégia experimental adotada por Garcia-Calvo *et al.* (1993), no presente trabalho, a toxina correspondente à margatoxina foi obtida com o fracionamento direto da peçonha bruta em uma coluna de fase reversa  $C_8$ .

Até o momento, alguns resultados interessantes foram obtidos relacionados com a caracterização da margatoxina, como a determinação de sua estrutura tridimensional por ressonância magnética nuclear (Johnson *et al.*, 1994), a obtenção do peptídeo sintético com o emprego da técnica de fase sólida e formação rápida das pontes dissulfeto em pH 8,2, onde o produto final foi analisado e apresentou

características físicas e biológicas indistinguíveis da toxina selvagem (Bednarek *et al.*, 1994). Sabendo-se que os canais para potássio têm um papel-chave no estabelecimento do potencial de repouso e na cascata de ativação dos linfócitos T humanos periféricos, a margatoxina foi testada em canais KV de membranas celulares de cérebro de ratos comprovando apresentar alta afinidade com este sub-tipo de canal (Helms *et al.*, 1997). Também foi observada alta afinidade da margatoxina em canais para potássio voltagem-dependentes e que promove aumento na liberação de dopamina, evidenciando um papel na repolarização das projeções *nigrostriatal* (Saria *et al.*, 1998). Outro efeito da margatoxina foi observado na expressão de mRNA *c-fos* por hibridação *in situ*, permitindo concluir que a inibição dos canais para potássio leva à ativação da transcrição de genes em neurônios o que pode desencadear a longo prazo mudanças na plasticidade do transmissor (Saria *et al.*, 2000).

As frações Cm10 (Figura 17) e Cm32 (Figura 18) correspondem a novos peptídeos.

Tais frações foram submetidas a uma nova etapa cromatográfica empregando-se agora uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Vydac 4,6 x 250 mm) a fim de se obter tais peptídeos em alto grau de pureza para as etapas posteriores de caracterização química e biológica.

As frações Cm10 e Cm32 foram submetidas ao seqüenciamento químico empregando-se a degradação de Edman em seqüenciador automático. Inicialmente, tais peptídeos foram reduzidos com DTT e alquilados com 4-vinilpiridina a fim proteger os resíduos de cisteínas presentes na estrutura de tais moléculas.

Alíquotas dos peptídeos reduzidos e alquilados foram também analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF a fim de se determinar o número de resíduos de cisteína presentes nos peptídeos (Figuras 19 e 20). No caso da fração Cm10, foi obtido o seguinte resultado: MM do peptídeo nativo = 2.608,15 Da e MM do peptídeo alquilado = 3.246,20 Da, evidenciando a presença de 6 resíduos de cisteína. No caso da fração Cm32, foi obtido o seguinte resultado: MM do peptídeo nativo = 3.375,00 Da e MM do peptídeo alquilado = 4.010,73 Da, evidenciando a presença de 6 resíduos de cisteína.

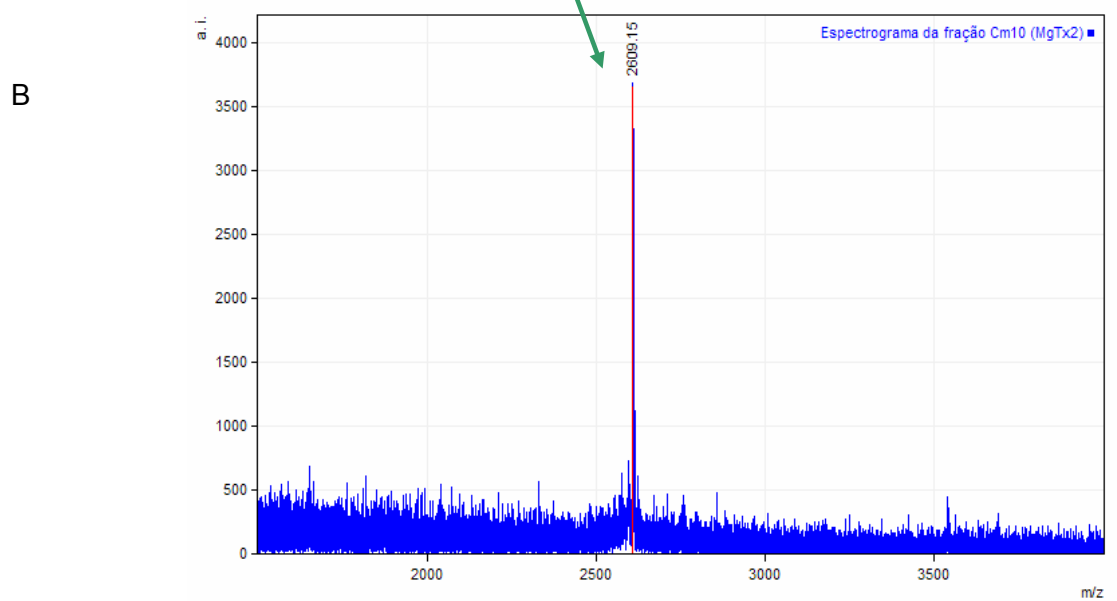
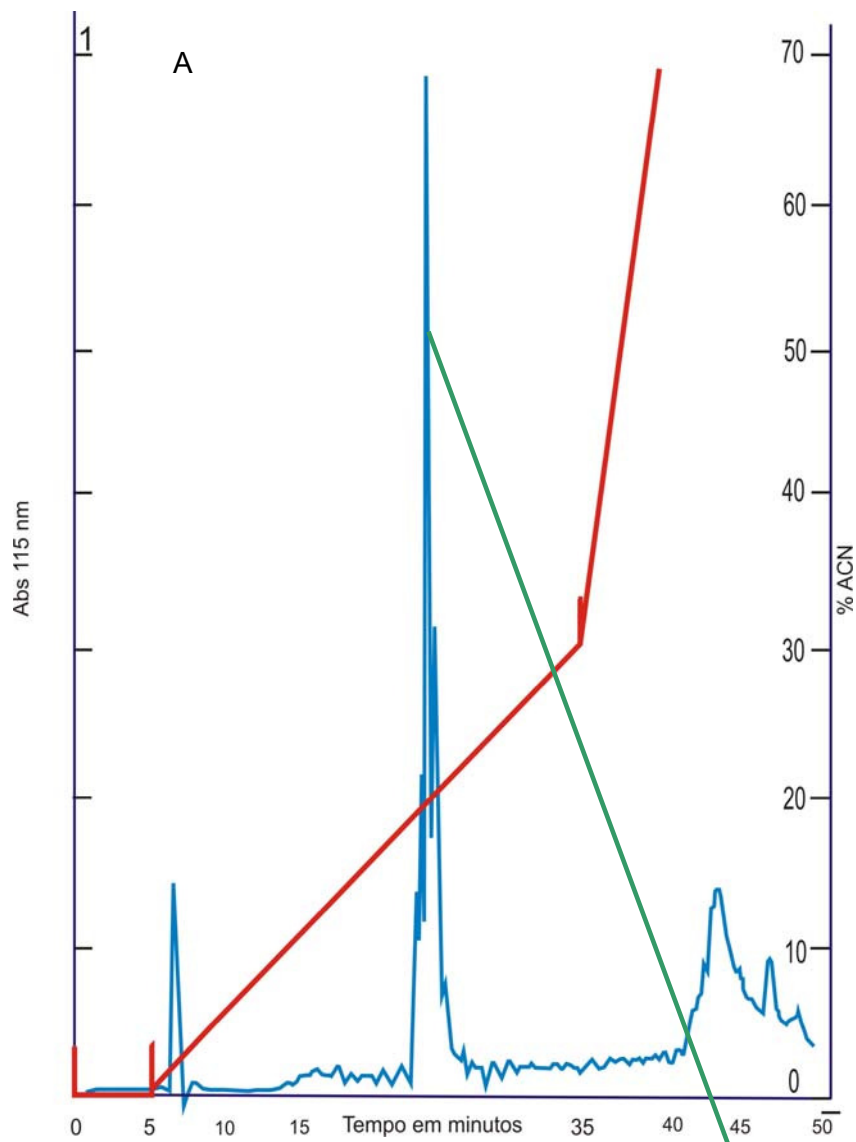


Figura 17. (A) Recromatografia por RP-HPLC da fração Cm10 em coluna C<sub>18</sub> (Vydac 4,6 x 250 mm). (B). Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina 2 (MgTx2) nativa.

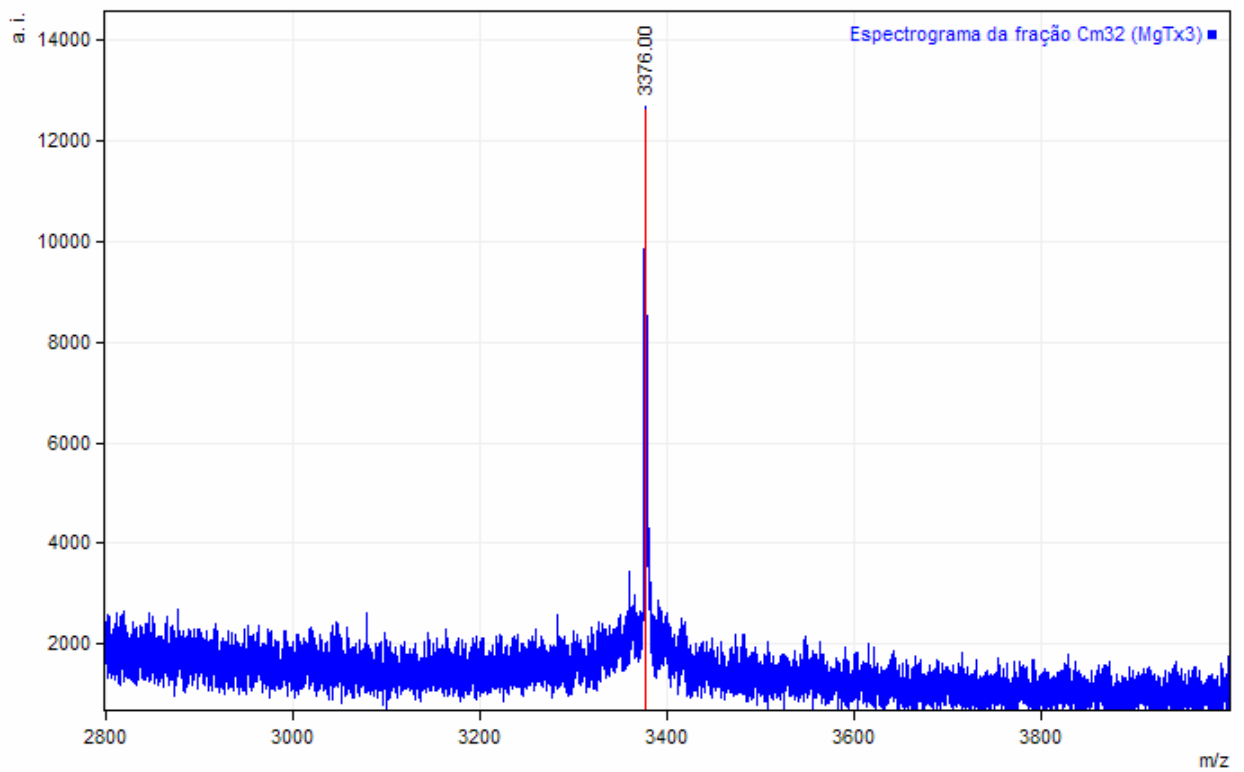


Figura 18. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina 3 (MgTx3) nativa.

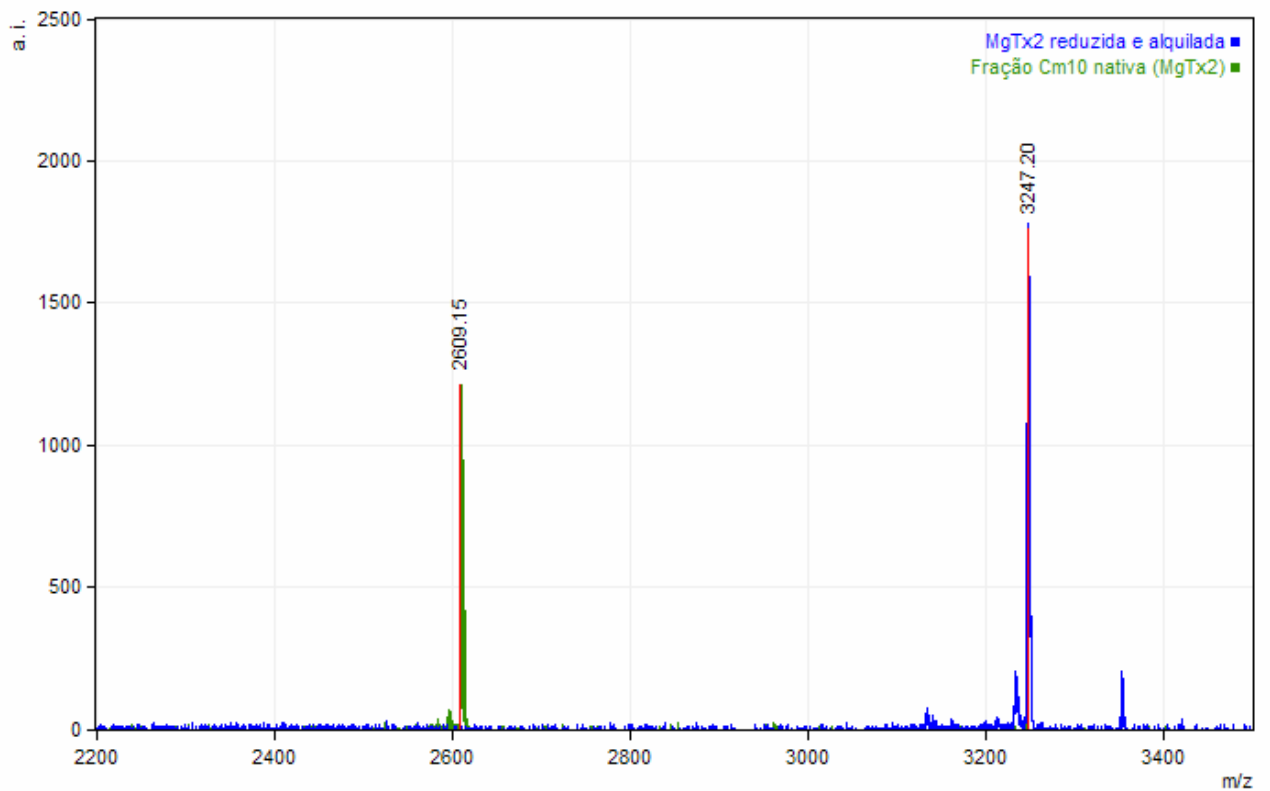


Figura 19. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina 2 (MgTx2) nativa (em roxo) e reduzida e alquilada (em azul).

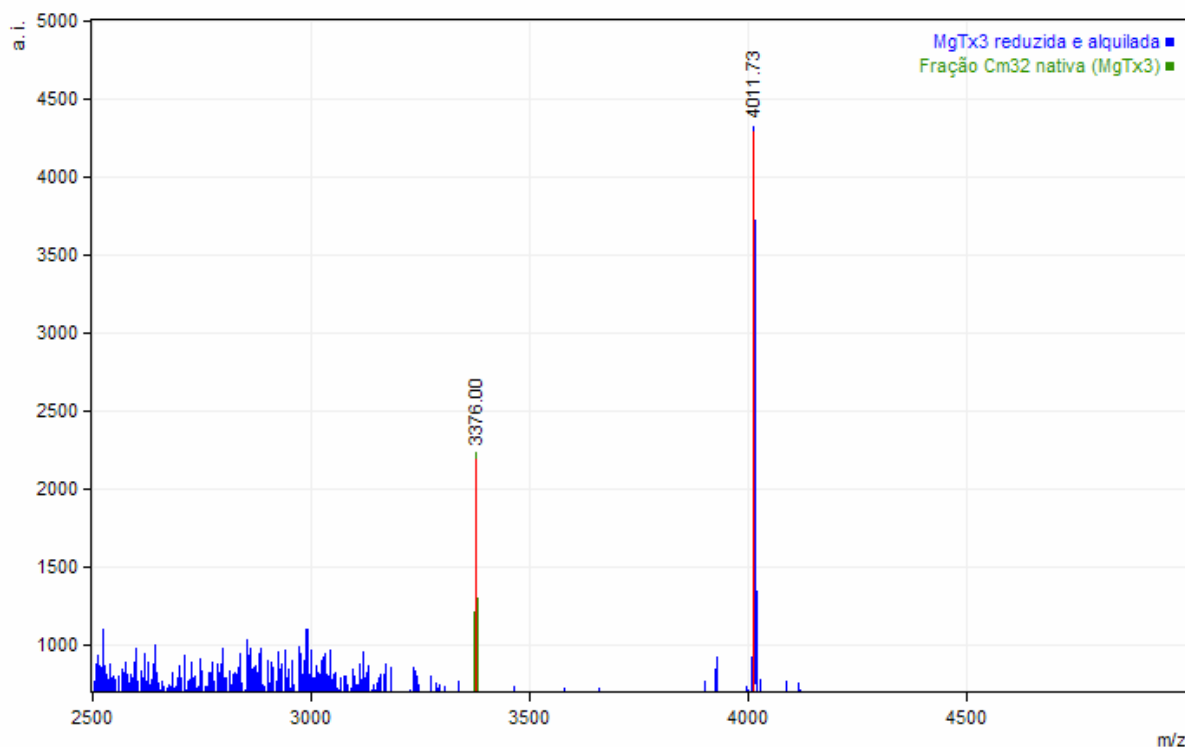


Figura 20. Espectrograma de massa (MALDI-TOF) da margatoxina 3 (MgTx3) nativa (em verde) e reduzida e alquilada (em azul).

## 5.8 SEQÜENCIAMENTO QUÍMICO

Foram obtidas as estruturas primárias dos dois peptídeos, denominados margatoxina 2 (Fração Cm10) e margatoxina 3 (Fração Cm32) (Tabela 6).

Tabela 6. Estruturas primárias das margatoxinas 2 e 3 isoladas da peçonha de *C. margaritatus*.

Nome da fração cromatográfica	Nome da toxina	Massa molecular (Da)	Estrutura primária	Similaridades
Cm10	MgTx2	2608	YGCEGCKGKCSTRGKCINGRCKCY	Tc1 de <i>Tityus cambridgei</i> Tpa1 de <i>T. pachyurus</i> Discrepina de <i>T. discrepans</i>
Cm32	MgTx3	3375	VCRTCEVVDGDQYFCPLLGYCKNNKCVCLP	Não detectada

A MgTx2 apresentou 65% de identidade com duas toxinas previamente descritas Tc1 de *Tityus cambridgei* (Batista *et al.*, 2002) e Tpa1 de *Tityus pachyurus* (Barona *et al.*, 2006), todas com atividade sobre canais para potássio de membranas

excitáveis e pertencentes à família das  $\alpha$ -KTx. Também apresentou 54% de identidade com a toxina denominada discrepina isolada da peçonha de *Tityus discrepans* (D'Suze *et al.*, 2004) (Figura 21).

Peptídeo	Seqüência	aa	I(%)
Tc1	-----ACGS-----CRKKCKGSG-KCINGRCKCY-	23	65
Tpa1	-----ACGS-----CRKKCKGPG-KCINGRCKCY-	23	65
MgTx2	-----YGCEG-----CKGKCSTRG-KCINGRCKCY-	24	100
Discrepina	QIDTNVKCSGSSKCVKICIDRYNTRGAKCINGRCTCYP	38	54
	*                   *           :           *   *****   **		

Figura 21. Multi-alinhamento feito pelo programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), entre a margatoxina 2 (MgTx2) e as toxinas Tc1 de *Tityus cambridgei*, Tpa1 de *T. pachyurus* e discrepina de *T. discrepans*, bem como os índices de identidade entre elas. Foram introduzidos espaços (*gaps*) de modo a aumentar o grau de pareamento entre as seqüências. \* = resíduos idênticos e : = substituições conservativas.

A MgTx3 não apresentou similaridades significativas com toxinas depositadas nos bancos públicos de seqüências de proteínas (busca feita via BLAST disponível no sítio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).



## 6. CONCLUSÕES

Este projeto de pesquisa teve como propósito ampliar o conhecimento acerca da composição bioquímica das peçonhas de escorpiões colombianos, em particular da espécie *Centruroides margaritatus*, coletada na região sudoeste da Colômbia no estado de Cauca.

A presença da espécie *C. margaritatus* no território colombiano foi confirmada, sendo agora o gênero *Centruroides* representado neste país por duas espécies, *C. margaritatus* e *C. gracilis*, potencialmente perigosas aos seres humanos.

Costatou-se uma diferença significativa na produção de peçonha entre machos e fêmeas desta espécie, onde as fêmeas produzem uma peçonha mais rica em componentes protéicos. Também se observou uma significativa redução na produção de peçonha em fêmeas grávidas, dentre as quais aquelas em avançado estado de gravidez chegam a não liberar peçonha quando estimuladas eletricamente.

A estratégia experimental adotada no fracionamento da peçonha de *C. margaritatus* foi adequada e permitiu constatar-se a grande diversidade de moléculas presentes nessa peçonha, com a eluição de 43 frações que foram analisadas por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF, resultando na detecção de 91 componentes com massas moleculares distintas.

A caracterização proteômica da peçonha de *C. margaritatus* permite concluir tratar-se de uma peçonha rica em peptídeos com massas moleculares correspondentes a toxinas que modulam canais voltagem-dependentes de sódio e potássio, sendo predominante a presença de peptídeos dentro da faixa de massas moleculares equivalentes a toxinas que agem especificamente nos canais para potássio voltagem-dependentes (54% do total).

Também foram isolados e caracterizados quimicamente dois novos peptídeos: a margatoxina 2 (MgTx2), com 24 resíduos de aminoácidos (MM = 2,6 kDa) e três pontes dissulfeto, pertencente à família das  $\alpha$ -KTx e a margatoxina 3 (MgTx3)

com 30 resíduos de aminoácidos (MM = 3,38 kDa) e três pontes dissulfeto. Trata-se de uma molécula inédita, sem similaridade com outras descritas na literatura.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Alagon, A.C.; Guzman, H.S.; Martin, B.N.; Ramírez, A.N.; Carbone. E.; Possani, L.D. 1988. Isolation and Characterization of two toxins from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Comp. Biochem. Physiol.* 81, 153-161.

Altschul, S.F.; Maden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.

Arantes, E. C.; Riccioppo-Neto, F.; Sampaio, S. V.; Vieira, C. A.; Giglio, J. R. 1994. Isolation and characterization of ttx-v, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na<sup>+</sup> channels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1, 69 -75.

Arantes, E.C.; Prado, W. A.; Sampaio, S. V.; Giglio, J. R. 1989. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTx-IV, a new neurotoxin. *Toxicon.* 27, 907-916.

Atakuziev, B. U.; Tashmukhamedov, A.B; Yukelson, L. 1995. Isolation and characterization of toxins from central Asian black scorpion. *Orthochirus scrobiculosos* venom. *Journal of Natural Toxins.* 4(2),115-28.

Ayerbe, S.; Guerrero-Vargas, J. A.; Rivas-Pava, M. P. 2003. Introducción a la toxinología. importancia en la conservación de especies consideradas peligrosas por ser venenosas. En: Polanco-Ochoa R. (Ed.). *Manejo de Fauna Silvestre en Amazonía y Latinoamérica.* Bogotá: CITES, Fundación Natura, 381-385.

Badher, R.V.; Thomas, A.B.; Harer, S.L.; Deshpande, A.D.; Salvin, N.; Waghmare, A. 2006. Intraspecific variation in protein pattern of red scorpion *Mesobuthus tamulus* Coconsis, Pocock, venoms from western and southern India. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.* 4, 612-619.

Barnes, R.D. 1995. *Zoología de los Invertebrados.* 4ª Ed. México: Editorial Interamericana, p 850.

Barona, J.; Batista, C.; Zamudio, F.; Gomez-Lagunas, F.; Wanke, E.; Otero, R.;

Possani, L.D. 2006. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels from the colombian scorpion *Tityus pachyurus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1764, 76-84

Barona, J.; Otero, R.; Núñez, V. 2004. Aspectos toxicológicos e inmunoquímicos del veneno del escorpión *Tityus pachyurus* pocock de Colombia: capacidad neutralizante de antivenenos producidos en Latinoamérica. *Biomédica*. 24, 42-49.

Batista, C.V.F.; Román-González, S.A.; Salas-Castillo, S.P.; Zamudio, F.Z.; Gómez-Lagunas, F.; Possani, L.D. 2007. Proteomic análisis of the venoms from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. C 146, 147-157.

Batista, C.V.F.; D'suze, G.; Gómez-Lagunas, F.; Zamudio, F.; Encarnación, S.; Sevcik, C.; Lucas, S.; Possani, L.D. 2006. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics*. 6, 3718-3727.

Batista, C.V.F., del Pozo, L., Zamudio, F.Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., Possani, L.D. 2004. Proteomics of the venom from the amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J Chromatogr B*. 803, 55-66.

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

Bednarek, M.; Bugianesi, R.; Leonard, R.; Felix, J. 1994. Chemical synthesis and structure-function studies of Margatoxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channel in human T lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 198, 619-625.

Borchani, I.; Stankiewicz, M.; Kopeyan, C.; Mansulle, P.; Kharrat, R.; Cestele, S.; Karoui, H.; Rochat, H.; Pelhate, M. El Ayeb, M. 1997. Purification, structure and activity of three insect toxins from *Buthus occitanus tunetanus* Venom. *Toxicon*. 35, 365-382.

Borges, A.; Garcia, C.C; Lugo, E.; Alfonso, M.J.; Jowers, M.J.; Op den Camp, H.J. 2006. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpiones, Buthidae): molecular, immunological, and mass spectral analyses. *Comp Biochem Physiol C*. 142, 240-252.

Bosmans, F.; Tytgat, J. 2007. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion  $\alpha$ -toxins. *Toxicon*. 49, 142-158.

Catterall, W.A.; Goldin A.L.; Waxman, S.G. 2005. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*. 57, 397-409.

Catterall, W.A.; Perez-Reyes, E.; Snutch, T.P.; Striessnig, J. 2005. International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*. 57, 411-425.

Centro de información gestión e investigación en toxicología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Base da datos Intoxicaciones 2005-2007. Microsoft Excel 2003.

Corona, M.; Coronas, F.V.; Merino, E.; Becerril, B.; Gutiérrez, R.; Rebolledo-Antunez, S.; García, D.E.; Possani, L.D. 2003. A novel class of peptide found in scorpion venom with neurodepressant effects in peripheral and central nervous system of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1649, 58-67.

Corona, M.; Gurrola, G.; Merino, E.; Cassulini, R.; Valdez-Cruz, N.; García, B.; Ramírez-Domínguez, M.; Coronas, F.; Zamudio, F.Z.; Wanke, E. Possani, L.D. 2002. A large number of novel Ergotoxin-like genes and ERG K<sup>+</sup>-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS letters*. 532, 121-126.

Corzo, G.; Escoubas, P.; Villegas, E.; Barnham, K.J.; He, W.; Norton, R.S. 2001. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J*. 359, 35-45.

Cunha, R.B. Castro, M.S.; Fontes, W. 2006. Espectrometria de massa de proteínas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 36, 40-46.

Cunha, R.B. 2003. Caracterização e seqüenciamento de peptídeos e proteínas por espectrometria de massas, Brasil. Brasília. (doutorado). Universidade de Brasília. Instituto de ciencias biológicas, Departamento de biología celular e molecular. pp 213.

Debin, J. A.; Strichartz, J. 1991. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leirus quinquestriatus*. *Toxicon*. 29, 1403-1408.

Dehesa-Davila, M.; Martin, B.; Nobile, M.; Prestipino, G.; Possani, L.D. 1994. Isolation of a toxin from *Centruroides infamatus infamatus* Koch scorpion venom that modifies Na<sup>+</sup> permeability on chick dorsal root ganglion cells. *Toxicon*. 32, 1487-1493.

Dehesa-Davila, M.; Ramírez, A.; Zamudio, F.; Gurrola-Briones, G.; Lievano, A.; Darzon, A.; Possani, L.D. 1996. Structural and functional comparison of toxins from the venom of the scorpions *Centruroides infamatus infamatus*, *Centruroides limpidus limpidus* and *Centruroides noxius*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2, 331-339.

Diego-Garcia, E.; Batista, CV.; Garcia-Gomez, Bl.; Lucas, S.; Candido, DM.; Gomez-Lagunas, F.; Possani, LD. 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon*. 45, 273-283.

Diniz, C.R.; Gomez, M.V.; Antônio, A.; Corrado, A.P. 1966. Chemical properties and biological activity of *Tityus* venom. *Mem Inst Butantan*. 33, 453-456.

Doyle, D.A.; Morais-Cabral, J.; Pfuetzner, A.K.; Gulbis, J.M.; Cohen, S.T.; Chait, B.T.; MacKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 280, 69-77.

D'suze, G.; Batista, C.V.F.; Frau, A.; Murgia, A.R.; Zamudio, F.Z.; Sevcik, C.; Possani, L.D.; Prestipino, G. 2004. Discrepin, a new peptide of the sub-family  $\alpha$ -KTx15, isolated from the scorpion *Tityus discrepans* irreversibly blocks K<sup>+</sup>-Channels ( $I_A$  currents) of cerebellum granular cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 430, 256-236.

D'suze, G.; Sevcik, C. 2000. Características biológicas del veneno. Disponível em [www.caibco.ucv.ve/escorpio/Venenode.htm](http://www.caibco.ucv.ve/escorpio/Venenode.htm). Acesso em. 28 dez. 2007.

D'suze, G.; Corona, F.; Possani, L.D.; Sevcik, C. 1996. High performance liquid chromatography purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. 34, 591-598.

Editorial. 2006. Mass spectrometry in toxinology: A 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms. *Toxicon*. 47, 609-613.

Eitan, M.; Fowler, E.; Herrmann, R.; Duval, A.; Pelhate, M.; Zlotkin, E. 1990. A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure and mode of action. *Biochemistry*. 29, 5941-5947.

Escobar, E.; Ochoa, J. 2003. Confirmación de la presencia de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae) en el Perú. Libro de resúmenes. XII Reunión Científica ICBAR. UNMSM.

Escobar, E.; Velásquez, L.; Rivera, C. 2003. Separación e identificación de algunas toxinas del veneno de *Centruroides margaritatus* (Gervais, 1841) (Scorpiones: Buthidae). *Revista peruana de biología*. 10, 217-220.

Favreau, P.; Menin, L.; Michalet, S.; Perret, F.; Cheneval, O.; Stocklin, M.; Bulet, P.; Stocklin, R. 2006. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*. 47, 676-687.

Ferreira, L. A.; Alves, E.W.; Henriques, O.B. 1993. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. 31, 941-947.

Flórez, E. 2007. Los escorpiones enigmáticos reliquias del pasado poco conocidas en Colombia. *Innovación y ciencia*. 4, 26-33.

Flórez, E. 2001. Escorpiones de la familia buthidae (chelicerata: scorpiones) de Colombia. *Biota Colombiana*. 2(1), 25-30.

Flórez, E. 2000. Biología y sistemática de los escorpiones de Colombia. Primer Congreso Colombiano de Zoología. Bogotá. pp 26.

Fontes, W.; Cunha, R.B.; Sousa, M.V.; Morhy, L. 1998. Improving the recovery of lysine in automated protein sequencing. *Anal. Biochem.* 258, 259-267.

García-Calvo, M.; Reid, L.; Novick, J.; Stevens, S.; Schmalhofer, W.; Kaczorowski, G.; García, I. 1993. Purification, Characterization, and Biosynthesis of Margatoxin, a Component of *Centruroides margaritatus* Venom that Selectively Inhibits voltage-dependent Potassium Channels. *The Journal of Biological Chemistry.* 25, 18866-18874.

García, M. L.; Gao, Y.; McManus, O. B.; Kaczorowski, G. J. 2001. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39, 739-748.

Gardiner, L. 1978. Biología de los invertebrados. Barcelona: Editorial Omega, p 950.

Gómez, J.P.; Otero, R. 2007. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública.* 25(1), 50-60.

Gómez, J.P.; Otero, R.; Núñez, V.; Saldarriaga, M.; Díaz, A.; Velásquez, M.P. 2002. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. *MEDUNAB.* 5, 159-165.

Gomez, M.V.; Diniz, C.R. 1966. Separation of toxic components from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. *Mem Inst Butantan,* 33:899-902.

González-Sponga, M. 1996. Guía para identificar escorpiones de Venezuela. Cuadernos Lagoven, p 2004.

Guerrero-Vargas, J. A.; Ayarbe, S.; Rada-Mendoza, M.; Vélez, P.; Beltran, J.; D'suze, G.; Fontes, W.; Sousa, M.V.; Castro, M. S. 2006. Preliminary toxicological characterization of the venom of the scorpion *Centruroides margaritatus* Buthidae, (Gervais, 1841) of the valey of the Patía, Colombia. *J. Venom. Anim Toxins incl. Trop. Dis.* 13, 1 p228.



Guerrero-Vargas, J. A.; Ayarbe, S.; Rada-Mendoza, M.; Vélez, P.; D'suze, G. 2003. Estandarización de la extracción de veneno del escorpión *Centruroides margaritatus* (Scorpionida: Buthidae), del municipio del Patía, determinación de la DL-50. Libro de resúmenes XXX Congreso Nacional de la Sociedad de Entomología. Cali, p 66.

Guerrero-Vargas, J. A. 2002. Aislamiento, purificación y evaluación de neurotoxinas del escorpión *centruroides margaritatus* (buthidae) del municipio de el Patía, departamento del Cauca, Colombia. Popayán. (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología. p 100.

Gulbis, J.M.; Mann, S.; MacKinnon, R. 1999. Structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunit. Cell. 97, 943-952.

Helms, L.; Felix, J.; Bugianesi, R.; Gracia, M.; Stevens, S.; Leonard, R.; Knaus, H. G.; Slaughter, S. 1997. Margatoxin Binds to homomultimer of K<sub>v</sub>1.3 channels in Jurkat cells, comparison with K<sub>v</sub>1.3 expressed in CHO cells. Biochemistry. 36, 3737-3744.

Holdridge, L. 1985. Diagrama para la clasificación de las zonas de vida o formaciones vegetales del mundo. Centro Científico Tropical. San José. Costa Rica. pp 150.

Inceoglu, B.; Lango, J.; Jing, J.; Chen, L.; Doymaz, F.; Pessah, I.; Hammock, B. 2003. One scorpion, two venoms: Prevenom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. PNAS. 3, 922-927.

Johnson, B.; Stevens, S.; Williamson, J. 1994. Determination of the three dimensional structure of margatoxin by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N Triple resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry. 33, 15061-15070.

Joseph, M. H.; Marsden, C.A. 1986. HPLC of small molecules a practical approach. Oxford. IRL Press Limited. Pp 100.

Jover, E., Couraud, F., Rochat, H. 1980 Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1607–1614.

Jover, E.; Massacrieer, A.; Cau, P.; Martin, M. F.; Couraud, F. 1988. The correlation between Na<sup>+</sup> Channel subunits and scorpion toxin-binding sites. A study in rat brain synaptosomes and in brain neurons developing *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 263, 1542-1548.

Kankonkar, R.C.; Kulkarni, D.G.; Hulikavi, C.B. 1998 Preparation of a potent anti-scorpion-venom-serum against the venom of red scorpion *Buthus tamulus*. *J. Postgrad Med.* 4, 85-91.

Kuhn-Netwig, I. 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and molecular life sciences.* 60, 2651-2668.

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

Li, Ya-Jun.; Tan, Zhi-Yong.; Ji, Yong-Hua. 2000. The binding of BmK IT2, a depressant insect-selective scorpion toxin on mammal and insect sodium channels. *Neuroscience Research.* 38, 257-264.

Lima, M.E.; Figueiredo, S.G., Pimenta, A.M.C.; Santos, D.M.; Borges, M.H.; Cordeiro, M.N.; Richardson, M.; Oliveira, L.C.; Stankiewicz, M.; Pelhate, M. 2007. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comparative Biochemistry and Physiology. C,* 146, 264-279.

Lima, M.E.; Martin, M.F.; Hue, B.; Loret, E.P.; Dinitz, C.R.; Rochat, H. 1989. On the binding of two scorpion toxins to the central nervous system of the cockroach *Periplaneta Americana*. *Insect Biochem.* 19, 413-422.

Loret, E.; Hammock, B. 2001. Structure and neurotoxicity of venoms. In : Brownell, P.; Polis, G. (Ed). *Scorpion Biology and Research*. Oxford. New York Oxford University Press, 204-233.

Loret, E.; Sampieri, F.; Miranda, F.; Granier, C.; Rochat, H. 1992. Scorpion toxins active on insects. *Methods Neuroscience*. 8, 381-395.

Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. 1951. Protein measurement with the folimphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 256-275.

Marinkelle, C.J.; Estahnke, H.L. 1965. Toxicological and clinical studies on *Centruroides margaritatus* (Gervais), a common scorpion in western Colombia. *Journal of Medical Entomology*. 2, 197-199.

Ménez, A.; Stocklin, R.; Mebs, D. 2006. The venomous system genome project. *Toxicon*. 47, 255-259.

Moerman, L.; Verdonck, F.; Willems, J.; Tytgat, J.; Bosteels, S. 2003. Antimicrobial peptides from scorpion venom induce  $Ca^{2+}$  signaling in HL-60 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 311, 90-97.

Moreau, M.E.; Garbacki, N.; Molinaro, G.; Brown, N.; Marceau, F.; Adam, A. 2005. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *Journal of Pharmacological Science*. 99, 6-38.

Nascimento DG, Rates B, Santos DM, Verano-Braga T, Barbosa-Silva A, Dutra AA, Biondi I, Martin-Eauclaire MF, De Lima ME, Pimenta AM. 2006. Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon* 47, 628-639.

Nelson, D; Cox, M.M. 2005 *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4<sup>a</sup> Ed. New York: W.H. Freeman and Company, p 1119.

Nisani, Z.; Dunbar, S.; Hayes, W. 2007. Cost of venom regeneration in *Parabuthus transvaalicus* (Arachnida: Buthidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. A. 147, 509-513

Olamendi-Portugal, T.; Garcia, B.I.; Lopez-Gonzalez, I.; Van Der Walt, J.; Dyason, K.; Ulens, C.; Tytgat, J.; Felix, R., Darszon, A.; Possani, L.D. 2002. Two new scorpion

toxins that target voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 562–568.

Otero, R.; Navío, E.; Céspedes, F.A; Núñez, M.J.; Lozano, L.; Moscoso, E.R.; Matallana, C.; García, J.; Rodas, J.; Gómez, J.P.; Barona, J.; Maturana, R.; Valderrama, R.; Paniagua, J.; Flórez, E.; Loureço, W.R. 2004. Scorpion envenoming en two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspect aspects. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.* 98, 742-750.

Otero, R., Uribe, F., Sierra, A. 1998. Envenenamiento escorpiónico en niños. *Actualizaciones Pediátricas.* 8(3), 88-92.

Palma, M.; Mendes, M.; Marques, M.; Souza, B.; Santos, L.; Santos, K. 2007. Fundamentos em análise proteômica, parte I. laboratório de biologia estrutural. Pp 110.

Pimenta AM, Stocklin R, Favreau P, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. 2001 Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun Mass Spectrom,* 15, 1562-1572.

Pineda, D.; Castellanos, J. 1998. Escorpionismo en girardot hospital san Rafael enero - junio de 1.994. *Tribuna Médica.* 98(1), 19-28.

Polis, G.; Sissom, D. 1990. Life History. Polis, G. (Ed). *The biology of scorpions.* Standford University press, 161-223.

Possani, L.D. 1984. Structure of scorpion toxins. A.T. (Ed). *Handbook of Natural Toxins.* Vol 2. Marcel Dekker, New York, 513-550.

Rack M.; Richter, D.; Rubly, N. 1987. Purification and characterization of a  $\beta$ -toxin from the venom of the African scorpion *Leirus quinquestriatus*. *FEBS.* 214, 163-166.

Ramírez, A.; Martín, B.; Gurrola, G.; Possani, L.D. 1994 Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Toxicon.* 4, 479-490.

Randall, D.; Burggeren, W.; French, K. 2000. *Fisiologia Animal mecanismos e adaptações*. 4<sup>a</sup>. Ed. Rio de Janeiro. Editorial Guanabara Koogan, p 729.

Rodríguez, Javier. 2008. Determinación del efecto clínico e histopatológico causado por el veneno del escorpión *Tityus pachyurus* (Buthidae) en ratones cepa ICR. Bogotá. (MSc en Toxicología) Universidad nacional de Colombia. Facultad de medicina, p 103.

Rodríguez de la Vega, R. C.; Possani, L. 2005. Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*. 46, 831-844.

Rodríguez de la Vega, R.C.; Possani, L.D. 2004. Current views on scorpion toxin specific for K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon*. 43, 865-875.

Rodríguez de la Vega, R.C.; Merino, E.; Becerril, B.; Possani, L.D. 2003. Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. *TRENDS in pharmacological sciences*. 24, 222-227.

Sampaio, Sv; Arantes Ec; Marangonis, E. 1996. Isolation of toxin TsTX-VI from *tityus serrulatus* scorpion venom. effects on the release of neurotransmitters from synaptosomes. *Biochem-Mol- Int*. 4, 39-48.

Saria, A.; Fischer, H.S.; humped, C.; Pfattner, A.; Schatz, D. Schuligoi, R. 2000. Margatoxin and iberiotoxin, two selective potassium channel inhibitors, induce c-fos like protein and mRNA in rat organotypic dorsal striatal slices. *Amino acids*. 19, 23-31.

Saria, A.; Seidl, C.V.; Fischer, H.S. Koch, R.; Humpel, C.; Garcia, M.; Knaus, H.G. 1998. margatoxin increases dopamine release in rat striatum via voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *European journal of pharmacology*. 343, 193-200.

Seabra, R. 2006. *Acidentes com animais peçonhentos*. Unesp, CEVAP, Botucatu, p 47

Shalabi, A.; Zamudio, F.; Wu, X.; Scaloni, A.; Possani, L.D.; Villereal, M.L. 2004. Tetraxandins, a new class of scorpion toxins that specifically inhibit store-operated calcium entry in human embryonic kidney-293 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 1040-1049.

Siegel, S.; Castellam, N.J. 2006. *Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento*. São Paulo, Artmed, Editora S.A, p 450.

Sisson, D. 1990. Systematics, biogeography and paleontology. Polis, G. (Ed). *Biology of scorpions*. Stanford, Stanford University Press, 64-161.

Siuzdak, G. 1996. *Mass spectrometry for biotechnology*. San Diego, Academic Press, p 161.

Stahnke, H.; Calos, M 1977. A key to the species of genus *Centruroides* Marx (Scorpionidae: Buthidae). *Entomological News*. 88, 111-120.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

Torres-Larios, A.; Gurrola, G.B; Zamudio, F.Z; Possani, L.D. 2000. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5023-5031

Torres, M. P.; Ibáñez, D.; Vásquez, E. 1992. Generalidades sobre la geología del norte del Valle del río Patía. *Novedades Colombianas*. 5, 1-26.

Tytgat, J.; Chandy, G.; García, M.; Gutman, G.; Martin, M.F.; van der Walt, J. Possani, L.D. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms:  $\alpha$ -KTx molecular subfamilies. *Trends in pharmacological sciences*. 20, 444-447.

Valderrama, Rafael., 1998 Envenenamiento por picadura de escorpiones. Primer simposio colombiano de toxicología. *Memorias del Primer Simposio Colombiano de Toxicología*. Medellín : Universidad de Antioquia, 169 -178.

Valvidia, H.H.; Fuentes, O.; El-Hayek, R.; Morrissette, J.; Coronado, R. 1991. Activation of the riodine receptor  $Ca^{2+}$  release channel of sarcoplasmatic reticulum by a novel scorpion venom. J. Biol. Chem. 266, 19135-19138.

Vega, A.; Felix, R. 2001. Fisiopatología de los canales iónicos sensibles a voltaje. Avance y Perspectiva. 20, 83-96.

Viquez, C. 2000. *Centruroides margaritatus* (Gervais,1841). Disponível em [www.inbio.eas.ualberta.ca/ubi/aranas/ubiespejo/](http://www.inbio.eas.ualberta.ca/ubi/aranas/ubiespejo/).html. Acesso em. 25 fev. 2006.

Wagner S, Castro MS, Barbosa JA, Fontes W, Schwartz EF, Sebben A, Rodrigues Pires O Jr, Sousa MV, Schwartz CA. 2003 Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. Toxicon. 41(7), 737-45.

Watt, D.D.; Simard, J.M. 1984. Neurotoxic proteins in scorpion venom. J. Toxicol. 3, 181-221.

Wu, J.J.; Dai, L.; Lan, Z.D.; Chi, C.W. 2000. The gene cloning and sequencing of Bm-12, a chlorotoxin-like peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. Toxicon. 38, 661-668.

Xian-Chum, Z.; San-Xia, W.; Yan, Z.; Shun-Yi, Z.; Wen-Xin, L. 2004. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii*. Peptides. 25, 143-150.

Yamaji, N; Dai, L.; Sugase, K.; Andriantsiferana, M.; Nakajima, T.; Iwashita, T., 2004. Solution structure of istx a male scorpion toxin from *Opisthacanthus madagascariensis* (ISCHNURIDAE). Eur. J. Biochem. 271, 3855-3864.

Zeng, X.C.; Wang, S.X.; Zhu, Y.; Zhu, S. Y.; Li, W. X. 2004. identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. Peptides. 25, 143-150.