

AValiação DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO VENENO DE BOTHROPS PUBESCENS

Darlene Lopes Rangel¹

Maria Eduarda Tabarez de Abreu²

Evelise Lais Carvalho³

Paulo Marcos Pinto⁴

Resumo:

No Brasil ocorrem 385 espécies de serpentes, das quais 62 são peçonhentas. As serpentes peçonhentas apresentam glândulas de veneno desenvolvidas e associadas a um aparelho inoculador, cuja função primária é subjugar e digerir suas presas. O gênero *Bothrops* compreende várias espécies de serpentes que ocorrem no continente americano, do México até a Argentina. *Bothrops pubescens* é uma serpente peçonhenta de porte médio que ocorre restritamente no Rio Grande do Sul e Uruguai. Foi observado que a dieta desta serpente consiste em lacraias, anfíbios, lagartos, serpentes, mamíferos e aves e há variação ontogenética na dieta, onde indivíduos pequenos alimentam-se principalmente de anfíbios e não consomem mamíferos, indivíduos de tamanho mediano predam todas as categorias de presa e indivíduos grandes consomem exclusivamente mamíferos. Essa variação na dieta pode levar a uma alteração na composição intraespécie do veneno. A composição do veneno do gênero *Bothrops* já é conhecido através da venômica ou indiretamente através de estudos transcriptômicos. Através desses estudos, foi elucidado famílias de proteínas que compõe o veneno, como metaloproteínases de veneno de cobras, serino proteases de veneno de cobras e fosfolipases A2. A variação na composição do veneno é notável e pode estar correlacionada com a filogenia, idade, sexo, distribuição geográfica e dieta. Tendo em vista a existência de variação na composição do veneno entre serpentes do gênero *Bothrops* e a ocorrência da espécie *B. pubescens* somente na região do Pampa e Uruguai, carecendo de estudos que elucidem a composição de seu veneno, esse trabalho objetivou caracterizar o veneno de *B. pubescens* através de técnicas eletroforéticas buscando encontrar semelhanças e diferenças em sua composição. Através do gel de poliacrilamida 15% podemos observar bandas entre 100 kDa e 23 kDa, sendo as bandas de 23 kDa proeminentes. Bandas observadas a entre 20 e 26 kDa correspondem possivelmente a presença de metaloproteínases de classe P1, assim como bandas de 50 a 60 kDa indicam metaloproteínases de classe P3. Foi possível também a identificação de outras bandas no gel que sugerem a variabilidade interespecies apresentada entre serpentes do gênero *Bothrops*. A variação observada no veneno de *B. pubescens* pode ocorrer devido ao seu habitat restrito a região do Pampa e Uruguai e também ao tipo de dieta adotada. Como perspectivas futuras temos a realização de testes in vitro para avaliação da atividade do veneno e a caracterização do veneno através do sequenciamento do proteoma por espectrometria de

massas.

Palavras-chave: serpente, eletroforese, Bioma Pampa

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO VENENO DE BOTHROPS PUBESCENS

¹ Aluno de pós-graduação. darlenelrangel@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. mariaeduardatabarez@gmail.com. Co-autor

³ Aluno de pós-graduação. eveliseleis@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente. paulopinto@unipampa.edu.br. Orientador

AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO VENENO DE *BOTHROPS PUBESCENS*

1 INTRODUÇÃO

No Brasil ocorrem 385 espécies de serpentes, das quais 62 são peçonhentas. As serpentes peçonhentas apresentam glândulas de veneno desenvolvidas e associadas a um aparelho inoculador, cuja função primária é subjugar e digerir suas presas (BERNARDE, 2014).

O gênero *Bothrops* compreende várias espécies de serpentes que ocorrem no continente americano, do México até a Argentina. No Brasil, são descritas pelo menos cerca de 25 espécies de serpentes deste gênero, que estão distribuídas por todo o território, em vários ambientes. Serpentes deste gênero são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos peçonhentos que ocorrem no país (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2007).

Representantes do grupo *Bothrops neuwiedi* são amplamente distribuídos em áreas que vão do noroeste do Brasil a sudeste da Argentina. *Bothrops erythromelas* é restrita a região da Caatinga, *B. lutzi*, *B. pauloensis* e *B. marmoratus* ocorrem principalmente no Cerrado, *B. matogrossensis* e *B. diporus* são distribuídas em Chaco, *B. pubescens* é limitada a região do Pampa, no sul do Brasil e no Uruguai e *B. neuwiedi* ocorre nas montanhas do sudeste brasileiro (MACHADO; SILVA; SILVA, 2014).

Bothrops pubescens é uma serpente peçonhenta de porte médio que ocorre restritamente no Rio Grande do Sul e Uruguai. Até recentemente era considerada uma das 12 subespécies de *B. neuwiedi*, mas foi elevada à categoria específica por Silva (2004). Foi observado que a dieta desta serpente consiste em lacraias, anfíbios, lagartos, serpentes, mamíferos e aves e há variação ontogenética na dieta, onde indivíduos pequenos alimentam-se principalmente de anfíbios e não consomem mamíferos, indivíduos de tamanho mediano predam todas as categorias de presa e indivíduos grandes consomem exclusivamente mamíferos. Essa variação na dieta pode levar a uma alteração na composição intraespécie do veneno (BORGES-MARTINS et al., 2007).

O veneno tem várias funções adaptativas para as serpentes, que são primariamente imobilizar, paralisar, matar, auxiliar na digestão da presa e como defesa contra possíveis inimigos (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2007).

Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por efeitos locais, incluindo hemorragia, edema, dor e mionecrose, assim como efeitos sistêmicos como coagulopatias e falha renal (CAVALCANTE et al., 2011).

A composição do veneno do gênero *Bothrops* já é conhecido através da venômica ou indiretamente através de estudos transcriptômicos. Através desses estudos, foi elucidado famílias de proteínas que compõe o veneno, como metaloproteínas de veneno de cobras (SVMP – do inglês, *snake venom metalloproteinase*), serino proteases de veneno de cobras (SVSP – do inglês, *snake venom serinoprotease*) e fosfolipases A2 (PLA2s) sendo as mais abundantes e mais frequentemente correlacionadas com os sintomas clínicos de envenenamento. A variação na composição do veneno é notável e pode estar correlacionada com a filogenia, idade, sexo, distribuição geográfica e dieta (ALAPE-GIRO et al., 2008).

Tendo em vista a existência de variação na composição do veneno entre serpentes do gênero *Bothrops* e a ocorrência da espécie *B. pubescens* somente na região do Pampa e Uruguai, carecendo de estudos que elucidem a composição de seu veneno, esse trabalho objetivou caracterizar o veneno de *B. pubescens* através de técnicas eletroforéticas buscando encontrar semelhanças e diferenças em sua composição.

2 METODOLOGIA

O veneno de um espécime de *Bothrops pubescens*, coletado na cidade de Santa Margarida do Sul, localidade Serrinha (coordenadas geográficas 30°25'46.99"S 54° 0'2.80"O), foi extraído através de massagem da glândula de veneno e aplicação de pressão das presas contra um Becker. O veneno extraído foi coletado com auxílio de uma pipeta e armazenado em freezer (- 20° C) até o uso.

Para a análise eletroforética foi realizada uma dosagem proteica através do aparelho NanoVue Plus (GE Health Care) utilizando um comprimento de onda de 280 nm.

A amostra de veneno foi submetida a SDS – PAGE 15%, seguindo o protocolo de Laemmli (1970), onde 17 µg de proteína foram desnaturados em tampão de amostra (água deionizada, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 0,5%) sob fervura durante 5 minutos. As proteínas foram separadas por eletroforese a 100 v e posteriormente coradas com Comassie Blue R250.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Através do gel de poliacrilamida podemos observar bandas entre 100 kDa e 23 kDa (Fig. 1), sendo as bandas de 23 kDa proeminentes.

Bandas observadas a entre 20 e 26 kDa correspondem possivelmente a presença de metaloproteinases de classe P1, assim como bandas de 50 a 60 kDa indicam metaloproteinases de classe P3. (FERNANDES et al., 2014). A presença de bandas que possivelmente correspondam a metaloproteinases sugere que o veneno tenha ações tais como indução de hemorragia local, reação inflamatória, ativação de fatores de coagulação e inibição da agregação plaquetária (SOUSA et al., 2013).

Foi possível também a identificação de outras bandas no gel que sugerem a variabilidade interespecies apresentada entre serpentes do gênero *Bothrops*. A variação observada no veneno de *B. pubescens* pode ocorrer devido ao seu habitat restrito a região do Pampa e Uruguai e também ao tipo de dieta adotada.

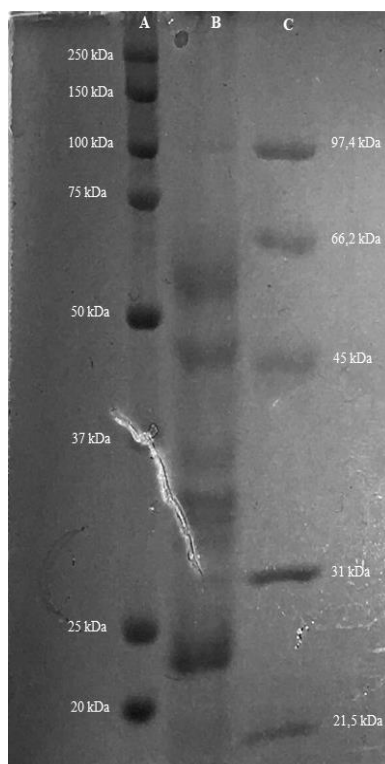


Fig. 1 – Perfil eletroforético de *B. pubescens*. 1 – marcador de peso molecular Precision Plus Protein Kaleidoscop Prestained Protein Standards da BioRad, 2 – veneno de *B. pubescens*, 3 – marcador de peso molecular SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range da Bio-Rad.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho apresentamos o perfil eletroforético do veneno de *B. pubescens*, uma espécie de serpente peçonhenta que ocorre somente na região do Pampa e Uruguai. Demonstramos que o veneno possui proteínas de tamanho entre 100 kDa e 23 kDa, sendo a banda entre 20 e 26 kDa e 50 e 60 kDa referentes a metaloproteínas já identificadas em outras espécies do gênero *Bothrops*, sugerindo uma atividade hemorrágica entre outros efeitos.

Como perspectivas futuras temos a realização de testes in vitro para avaliação da atividade do veneno e a caracterização do veneno através do sequenciamento do proteoma por espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

ALAPE-GIRO, A.; SANZ, L.; FLORES-DI, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J. J.; RICA, C. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 3556–3571, 2008.

BERNARDE, P. S. **Serpentes Peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. 1. ed., 2014, 223 p.

BORGES-MARTINS, M.; ALVES, M.L.M.; ARAUJO, M.L. de; OLIVEIRA, R.B. de & ANÉS, A.C. 2007. Répteis p. 292-315. In: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS & L.A. MOURA (orgs.) Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 385 p.

- CAVALCANTE, W. L.; HERNANDEZ-OLIVEIRA, S.; GALBIATTI, C.; RANDAZZO-MOURA, P.; ROCHA, T.; PONCE-SOTO, L.; MARANGONI, S.; PAI-SILVA, M. D.; GALLACCI, M.; DA CRUZ-HÖFLING, M. a; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biological characterization of Bothrops marajoensis snake venom. **Journal of venom research**, v. 2, n. October, p. 37–41, 2011.
- FERNANDES, C. T.; GIARETTA, V. M.; PRUDENCIO, L. S.; TOLEDO, E. O.; DA SILVA, I. R.; COLLACO, R. C.; BARBOSA, A. M.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; COGO, J. C. Neuromuscular activity of Bothrops fonsecai snake venom in vertebrate preparations. **J Venom Res**, v. 5, p. 6–15, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- MACHADO, T.; SILVA, V. X.; SILVA, M. J. de J. Phylogenetic relationships within Bothrops neuwiedi group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, n. 1, p. 1–14, 2014.
- NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E. **Herpetologia no Brasil II**. [s.l.: s.n.]
- SILVA, V. X. The Bothrops neuwiedi Complex. In: **Campbell, Jonathan A. Lamar, William W. The venomous reptiles of the western hemisphere**. First edit ed. [s.l.] Cornell University Press, 2004.
- SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H. V.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANO-MARTINS, I. S.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, 2013.