



# ESTUDO DA TOXICIDADE DA PEÇONHA DE *Bothrops jararaca* SOBRE A MEMBRANA CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

Thais Heloise da Silva Almeida<sup>1\*</sup>, Paulo Ricardo Romão Monteiro<sup>3</sup>, Victor Felipe da Silva Araújo<sup>1</sup>, Marliete Maria Soares da Silva<sup>1</sup>, Jeine Emanuele dos Santos Silva<sup>1</sup>, José Ferreira da Silva-Neto<sup>3</sup>, George Chaves Jimenez<sup>3</sup>, Joaquim Evêncio-Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biofísica Teórica Experimental e Computacional, UFRPE; <sup>2</sup>Laboratório de Histologia, UFRPE, <sup>3</sup>Laboratório de Farmacologia, UFRPE

\*thaisalmeida@veterinaria.med.br

## INTRODUÇÃO

Acidentes com serpentes peçonhentas são considerados um problema de saúde pública, especialmente em regiões onde as atividades rurais são significativas, como África, Ásia, América Latina e Nova Guiné (CHIPPAUX, 2017). No Brasil, cerca de 90% dos acidentes com serpentes peçonhentas são atribuídos ao gênero *Bothrops*, popularmente conhecido como jararacas (BRASIL, 2018). A composição da peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* é complexa, onde algumas proteínas como as metaloproteases, serinoproteases, miotoxinas, fosfolipase A<sub>2</sub>, hialuronidases, L-aminoácido-oxidases e acetilcolinesterases conjuntamente com os peptídeos representam a maior fração dos componentes biologicamente ativos (KANG et al., 2011).

O acidente botrópico produz três principais ações: proteolítica, coagulante e hemorrágica, as quais são desencadeadas pela ativação conjunta das principais toxinas presentes na peçonha (MELGAREJO, 2010).

No Brasil, a espécie *Bothrops jararaca* se destaca em relação ao percentual de participação nos acidentes ofídicos com humanos, embora pode também ser identificada em países como Argentina e Paraguai. No Brasil a sua distribuição ocorre desde o Sul do Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, razão pela qual é geralmente abordada para a produção de soro antiofídico para esta característica de ofidismo. (RIBEIRO et al., 2001).

Dentre os modelos experimentais que se mostram como excelentes ferramentas para estudos em sistemas biológicos e considerando-se que cerca de 30% dos genes envolvidos em doenças humanas podem ter homologia no proteoma de levedura, em especial *Saccharomyces cerevisiae*, seus sistemas de cultivo têm se mostrado como uma importante alternativa no delineamento de protocolos experimentais como estudos sobre o ciclo celular (NASHEUER et al., 2002), envelhecimento (MURAKAMI et al., 2009), expressão gênica (BIDDICK et al., 2009), apoptose (OWSIANOWSKI et al., 2008), transdução de sinal (HOHMANN et al., 2007), metabolismo (LOPEZ-MIRABAL et al., 2008), distúrbios neurodegenerativos (MILLER-FLEMING et al., 2008), vias moleculares e celulares de doenças humanas, incluindo o câncer e ensaios de toxicidade (KARATHIA et al., 2011), especialmente como alternativa aos modelos com emprego de animais (GOURMELON; DELRUE, 2016).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade da peçonha de *B. jararaca* sobre a membrana celular de *S. cerevisiae* nas dimensões estrutural e metabólica, e adicionalmente, verificar a possibilidade de utilização deste modelo experimental em estudos de toxicidade de venenos animais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o protocolo experimental foram utilizadas células liofilizadas de *S. cerevisiae* da marca comercial Fleischmann®, produzidas por AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. A peçonha de *B. jararaca* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas (LAPTx) da UFPE.

Para os ensaios de crescimento em cultivo foi utilizado o meio YED (2,0% de extrato de levedura e 2,0% de dextrose) e água destilada como solvente. A levedura foi reativada (solução 5%) em meio YED (33 - 35°C) por 30 minutos em estufa e a viabilidade celular foi avaliada mediante o uso de azul de Tripan 0,25%. O número de células foi ajustado para 10<sup>5</sup> e foram distribuídas em recipientes apropriados para os devidos ensaios, contendo meio YED e conforme a preparação: Tubo controle (sem substâncias desafiadoras), Tubo experimental (peçonha 1 ml a c = 1 mg/mL). O cultivo foi mantido por 10 horas a 33°C e umidade relativa superior a 70%. A cada 1 hora, alíquotas de 2 mL eram retiradas para avaliação da densidade óptica em espectrofotômetro, marca Biochrom, modelo Libra S22, a 620 nm. Os valores das leituras de absorbância, em etapa posterior, foram comparados com o valor de referência estabelecido no início do cultivo, convertidos em número de células e a relação entre a variação do número de células e o tipo de preparação foi obtida. Para a avaliação dos impactos das preparações sobre as estruturas físicas das membranas celulares, foram comparados os respectivos números de células após 10 horas de cultivo, usando-se como referência a preparação do grupo controle. Para avaliação da taxa de crescimento celular se fez necessário a obtenção da curva de crescimento em cada preparação. Os parâmetros de regressão da porção linear da curva de crescimento foram obtidos juntamente ao coeficiente de determinação. O coeficiente angular de cada curva foi utilizado como parâmetro de avaliação da taxa de crescimento celular em cada preparação. Os testes foram realizados em triplicata e os dados expressos em termos de média e desvio padrão, sendo as diferenças estatísticas avaliadas por aplicação do teste de normalidade Shapiro Wilks, seguido do teste t de Student, considerando-se como valor descritivo p < 0,05 para ambos. A tabulação de dados e os testes estatísticos foram efetuados mediante o emprego de planilha estatística do programa excel da Microsoft® versão 2010.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Frente as condições experimentais disponibilizadas na realização dos bioensaios, verificou-se em sistemas de cultivo de *S. cerevisiae*

que após 10 horas de observação não ocorreram diferenças significativas entre as preparações estimuladas com a peçonha de *B. jararaca* em relação às preparações do grupo controle, para um valor de  $p < 0,05$  conforme mostram os dados da figura 1. Disto verifica-se que nesta etapa de cultivo não ocorreu diminuição significativa do número de células em relação ao grupo controle, sugerindo a não ocorrência de efeitos deletérios sobre a estrutura de membrana celular das unidades de leveduras.

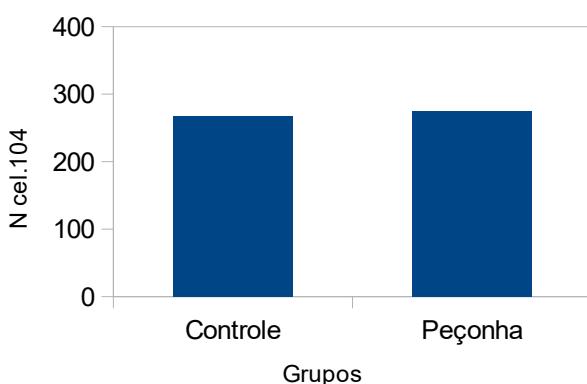


Figura 1. Efeito da peçonha de *B. jararaca* (1 mg/ mL) em culturas de *S. cerevisiae*, após 10 horas de cultivo.

Este resultado nos levou a verificar se as interferências poderiam ter ocorrido ao nível do metabolismo destas estruturas celulares em condições de cultivo, por meio da avaliação da taxa de crescimento celular ao longo do tempo, cuja análise indica que em cada sistema de cultivo ocorreu aumento do número de células de forma característica, onde a fase de crescimento linear até a 10<sup>a</sup> hora de cultivo pode ser descrita por uma função do tipo  $y = aX + b$ , onde "y" representa o número de células num dado período "X" em horas, "a" seria o coeficiente angular da função e "b" o coeficiente linear. Para avaliar a qualidade do ajuste de cada função, no processo de regressão linear, foi obtido o coeficiente de determinação "R<sup>2</sup>", conforme mostram os dados da tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de regressão linear das curvas de crescimento celular sob diferentes condições de cultivo.

Tratamento	$a$ (cel.10 <sup>4</sup> /(mL.h))	$b$ (cel.10 <sup>4</sup> /(mL))	R <sup>2</sup>
Controle	4,80	221,48	0,725
Peçonha	1,98	254,57	0,34

Considerando-se que o coeficiente angular de uma função é proporcional a taxa de crescimento celular e sendo a função obtida aquela que descreve a variação do número de células em função da variação temporal do tipo linear, pode-se dizer que a taxa de crescimento é o próprio coeficiente angular, que é constante nesta fase de crescimento, portanto sendo independente o tempo de reação. Sendo assim, na figura 2, fica evidente que a peçonha de *B. jararaca* inibiu de forma significativa a taxa de crescimento celular em sistema de cultivo de *S. cerevisiae*, em relação às preparações de controle para um valor de  $p < 0,05$ .

Este resultado é compatível com os resultados observados por Gomes et al. (2005), onde verificaram que frações da peçonha de *B. jararaca* inibiam o crescimento das células de *S. cerevisiae* em diferentes concentrações. Os autores atribuíram este efeito à inibição da H<sup>+</sup> - ATPase da membrana plasmática das células de levedura ou por um aumento da permeabilidade aos íons H<sup>+</sup>. É interessante destacar que estes autores não assinalaram a ocorrência de processos lesivos nas estruturas destas membranas, sendo este efeito possivelmente mais caracterizado como uma interferência num domínio de ordem metabólica.

Considerando-se que a homeostasia na dimensão iônica é um evento crítico para diversos processos fisiológicos, como na relação biossíntese/degradação, enovelamento, endereçamento de proteínas, secreção de mediadores, fusão e divisão de membranas, morfogênese de organelas e estruturas celulares, dinâmica de microtúbulos e divisão celular, as modificações significativas nas condições de manutenção do estado homeostásico podem estar relacionados à ocorrência de fenômenos patológicos e ameaça das condições vitais em sistemas biológicos (VOET et al., 2000).

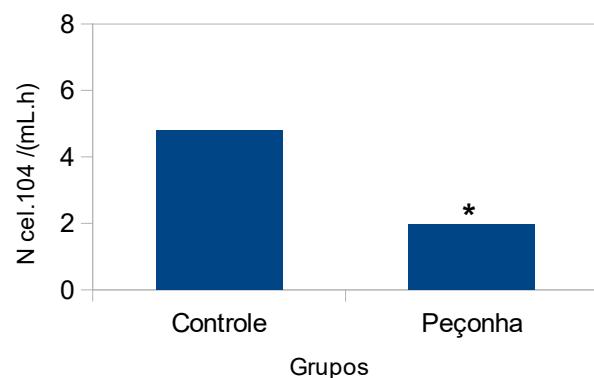


Figura 2. Taxa de crescimento celular de *S. cerevisiae* em diferentes condições. \* Diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

Estes resultados preliminares sugerem que a peçonha de *B. jararaca* é capaz de promover alterações metabólicas, na membrana celular de *S. cerevisiae*. A possibilidade de utilizar células de *S. cerevisiae* como modelo experimental para estudos de toxicidade de venenos animais em células eucarióticas é bastante interessante, pois trata-se de uma alternativa à utilização de modelos experimentais com animais.

## REFERÊNCIAS

- BIDDICK, R.; YOUNG, E. T. The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast*, v. 26, p. 205-220, 2009.
- BRASIL, SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN. Acidente por animais peçonhentos - Notificações Registradas: banco de dados. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animais.br.def> Acesso em: 04 set. 2018.
- CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 23, n. 1, p. 1-2, 2017.
- GOMES, V.M.; CARVALHO, A.O.; DA CUNHA, M. et al. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v. 45, p. 817-27, 2005.
- GORQUELON, A.; DELRUE, N. Validation in support of internationally harmonised OECD test guidelines for assessing the safety of chemicals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 856, p. 9-32, 2016.
- HOHMANN, S.; KRANTZ, M.; NORDLANDER, B. Yeast osmoregulation. *Methods Enzymology*, v. 428, p. 29-45, 2007.
- KANG, T.S.; GEORGIEVA D.; GENOV, N. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS Journal*, v. 278, n. 23, p. 4544-4576, 2011.
- KARATHIA, H. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *Plos One*, v. 6, n. 2, p. 1-10. 2011.

LOPEZ-MIRABAL, H. R.; WINTHER, J. R. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1783, n. 4, p. 629-640. 2008.

MELGAREJO, A. R. *Serpentes Peçonhentas: principais grupos, identificação, veneno, acidentes e primeiros socorros* [s.d.] Disponível em: <https://docplayer.com.br/55108214-Serpentes-peconhentas-principais-grupos-identificacao-veneno-acidentes-e-primeiros-socorros-anibal-r-melgarejo-biologo-phd.html>. Acesso em: 03 Jun. 2018.

MILLER-FLEMING, L. GIORGINI, F.; OUTEIRO, T. F. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnology Journal*, v. 3, p. 325-338. 2008.

MURAKAMI, C.; KAEBERLEIN, M. Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells. *Journal of Visualized Experiments*, v. 27, p. e1156, 2009.

NASHEUER, H.P.; SMITH, R.; BAUERSCHMIDT, C. et al. Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, v. 72, p. 41-94. 2002.

OWSIANOWSKI, E.; WALTER, D.; FAHRENKROG, B. Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1783, p. 1303-1310, 2008.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T; LEBRÃO, M. L. Prognostic factors for local necrosis in *Bothrops jararaca* (Brazilian pit viper) bites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.95, n. 6, p. 630-4. 2001.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.