



Saccharomyces cerevisiae PDI* como modelo de estudo do extrato de *Mucuna pruriens

Saccharomyces cerevisiae PDI as a study model of Mucuna pruriens extract

Leticia Scussel Farias *, **Cleverson Busso[†]**, **Mario Henrique de Barros[‡]**

RESUMO

A *Mucuna* é utilizada na medicina tradicional indígena e indiana há milhares de anos, reconhecida como fonte natural de L-dopa, precursor direto do neurotransmissor dopamina, encontrada em baixos níveis na doença de *Parkinson (DP)*. As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela formação de agregados proteicos, associadas ao envelhecimento e catalisadas pelo estresse oxidativo, acarretando disfunções metabólicas no organismo. Diante disso objetivou-se avaliar a ação do extrato de sementes de *Mucuna pruriens* perante a proteína alfa-sinucleína, responsável pela formação de agregados na DP, expressa pela linhagem *S. cerevisiae PDI*, em condições de estresse oxidativo induzido, favorecendo a expressão da proteína alfa-sinucleína e consequentemente a morte celular. Os desafios foram realizados utilizando menadione, agente estressor, nas concentrações de 0,25 mM (etapa 1) e 2,5 mM (etapa 2), avaliando-se a ação do extrato à 10% p/v por meio da taxa de sobrevivência celular após o desafio, e por conseguinte avaliou-se estatisticamente os resultados. Por meio destes visualizou-se que o tratamento com extrato de sementes de *Mucuna* foi capaz de proteger a célula dos efeitos nocivos oxidantes comparada à ação do menadione, indicando propriedades de remediação de radicais livres e toxicidade da proteína alfa-sinucleína.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae PDI*, Células de levedura mutante, Modelo *in vivo*, *Mucuna pruriens*.

ABSTRACT

Mucuna has been used in traditional Indian and Indian medicine for thousands of years, recognized as a natural source of L-dopa, a direct precursor of the neurotransmitter dopamine, found at low levels in Parkinson's disease (PD). Neurodegenerative diseases are characterized by the formation of protein aggregates, associated with aging and catalyzed by oxidative stress, causing metabolic disorders in the body. Therefore, the objective was to evaluate the action of *Mucuna pruriens* seed extract against the alpha-synuclein protein, responsible for the formation of aggregates in PD, expressed by the *S. cerevisiae PDI* strain, under conditions of induced oxidative stress, favoring the expression of the protein alpha-synuclein and consequently cell death. The challenges were performed using menadione, a stressor, at concentrations of 0.25 mM (step 1) and 2.5 mM (step 2), evaluating the action of the extract at 10% w/v through the survival rate after challenge, and therefore the results were statistically evaluated. Through these, it was observed that the treatment with *Mucuna* seed extract was able to protect the cell from harmful oxidative effects compared to the action of menadione, indicating properties of free radical remediation and toxicity of the alpha-synuclein protein.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae PDI*, mutant yeast cells, *in vivo* model, *Mucuna pruriens*.

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil; leticiafarias@alunos.utfpr.edu.br

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo; cleversonbusso@utfpr.edu.br

[‡] Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil; mhbarros@usp.br



1 INTRODUÇÃO

As plantas estão presentes na medicina há milhares de anos, sendo base de sistemas sofisticados de medicinas tradicionais, onde originalmente eram utilizadas de forma empírica. Atualmente, devido a comprovação científica de suas propriedades e eficácia, as plantas foram transformadas em produtos formulados de valor agregado, sendo utilizadas no tratamento de diversas disfunções do organismo.

A *Mucuna pruriens* é uma planta trepadeira da família Fabaceae originária de climas tropicais, nativa da Índia e Antilhas presente em regiões da América Central e nas regiões tropicais da América do Sul (VIDAL; SILVA-LOPEZ, 2010). Suas propriedades farmacológicas são conhecidas desde a antiguidade, estando presente na composição de mais de 200 formulações de drogas indígenas, além de ser utilizada na medicina *Ayurveda* (medicina tradicional da Índia) (VIDAL; SILVA-LOPEZ, 2010).

A importância do estudo das propriedades farmacológicas das sementes de *Mucuna* estão relacionadas a suas possíveis ações no sistema nervoso central, revelando-se fonte natural de L-dopa, um precursor direto do neurotransmissor dopamina, apresentada em baixos níveis em disfunções como na doença de *Parkinson (DP)* (LONGHI, 2007).

As doenças neurodegenerativas em geral são marcadas pela disfunção e morte de neurônios no cérebro e/ou medula espinal, sendo estas associadas com o envelhecimento, levando em última instância a problemas motores, cognitivos e/ou demência. Sendo assim, as doenças neurodegenerativas representaram um problema em ascensão para a saúde pública mundial nas próximas décadas (SEGOVIA, 2018; TENREIRO; OUTEIRO, 2015).

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pelo acúmulo de agregados proteicos, que interferem em processos celulares normais causando disfunções e/ou morte neural devido ao mal dobramento e agregação das proteínas (PERFEITO e REGO, 2012; SEGOVIA, 2018; TENREIRO; OUTEIRO, 2015). Apesar da etiologia desconhecida, a DP possui como característica a formação de agregados proteicos insolúveis ricos em alfa-sinucleína (corpos de Lewy), aumento da reatividade glial e de processos neuro-inflamatórios (SEGOVIA, 2018).

Sabe-se também que a agregação da alfa-sinucleína desencadeia uma série de mecanismos de toxicidade que envolvem aumento do estresse oxidativo por meio do aprisionamento de mitocôndrias pela alfa-sinucleína levando a falhas no sistema bioenergético da célula, além de causar disfunções mitocondriais; aumento da autofagia e do proteassoma; alterações do tráfego vesicular e da endocitose (SEGOVIA, 2018; ZAMPOL, 2013).

Desta forma, visa-se descobrir se as propriedades farmacológicas da *Mucuna pruriens* conhecidas empiricamente possuem correlações com a proteína alfa-sinucleína e seus agregados, além de questionar sua ação perante ao estresse oxidativo, quando o organismo está exposto a uma alta demanda de radicais livres.

Sendo assim, com o intuito de utilizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo *in vivo* para avaliar a ação do extrato de *Mucuna pruriens* perante a ação da proteína alfa-sinucleína, o presente trabalho objetiva-se em utilizar a linhagem mutante *S. cerevisiae PDI*, obtida no estudo de ZAMPOL (2013), em condições de estresse induzido por meio da utilização do agente estressor Menadione, o qual promove a ação de radicais livres favorecendo a ação da proteína alfa-sinucleína e a morte celular. A linhagem *S. cerevisiae PDI* contém o gene SNCA codificador da proteína alfa-sinucleína, sendo este regulado pelo promotor GAL10, viabilizando estudos de interação *in vivo* da proteína alfa-sinucleína mediante a utilização de sistemas eucarióticos unicelulares (ZAMPOL, 2013).

Estudos como os de LIEU *et al.* (2010) observaram que tratamentos administrados com L-dopa naturalmente extraída de *Mucuna* produziram resultados melhores quando comparados com a droga sintética.



Segundo ANDRADE (2018), a administração de *Mucuna pruriens* no tratamento em modelos animais parkinsonianos apresentaram neuroproteção e restauração de níveis de dopamina na substância nigra e norepinefrina no trato nigroestriatal, mostraram-se de 2 a 3 vezes mais eficientes que a L-dopa sintética perante ao controle de sintomas motores.

Desta forma, evidencia-se a importância do estudo da utilização da planta *Mucuna pruriens* como fonte alternativa para diversos tratamentos, em especial de doenças neurodegenerativas, assim como o reconhecimento das suas propriedades farmacológicas, objetivando-se a descoberta de drogas destinadas à medicina humana, além de proporcionar novas aplicações da matéria-prima em questão.

2 MÉTODO (OU PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DA PESQUISA)

O presente estudo realizou-se em 3 etapas, sendo estas: 1- Obtenção do extrato liofilizado de sementes de *Mucuna pruriens*; 2- Desafios com a linhagem *S. cerevisiae PDI*; 3- Análise estatística e discussão dos dados.

2.1 Obtenção do extrato liofilizado de *Mucuna pruriens*

As sementes foram obtidas comercialmente e precedidas de moagem com o auxílio de um moinho de facas, posteriormente para obtenção do extrato, pesou-se 1 grama de semente de *Mucuna pruriens* moída em um erlenmeyer para cada 10 mL de água destilada. O extrato foi mantido por 24 horas a 40 °C sob agitação orbital de 200 rpm, sendo este protegido da luz utilizando-se de papel alumínio ou papel kraft em seu entorno.

Após o período de 24 horas, realizou-se a centrifugação do extrato para a separação de particulados do sobrenadante e posteriormente uma filtração a vácuo utilizando papel filtro qualitativo. Por conseguinte filtrou-se o extrato em um sistema de filtração Millipore® com membrana de poros com 0,22 µm de diâmetro para eliminação de contaminantes. Por conseguinte, armazenou-se o filtrado em tubos tipo falcon em temperatura de -40 °C no ultrafreezer durante 24 horas para posterior liofilização do mesmo, mantendo-os protegidos da luz e calor. A liofilização foi realizada a vácuo menor que 500 µHg durante sete dias, utilizando-se os equipamentos descritos no laboratório Multiusuário Central Analítica da UTFPR - Toledo.

2.2 Desafios com a linhagem *Saccharomyces cerevisiae PDI*

Para a utilização da linhagem *S. cerevisiae PDI* foi realizado um pré-inóculo em 30 mL de meio YNB previamente autoclavado, sendo este mantido a 30°C em 150 rpm *overnight*. Após este período, o inóculo foi plaqueado em meio YPGAL e incubado por 3 dias em BOD à 30 °C. Após o crescimento microbiano da linhagem, com a presença de galactose, foi realizado o inóculo em caldo YPD de uma alíquota de células da placa recém preparada, mantendo-a em rotação orbital de 150 rpm a 30 °C. Após este período, o inóculo foi utilizado nos tratamentos respectivos ao estudo, sendo este distribuído em frascos erlenmeyers com volume final de 30 mL em uma absorbância ajustada de OD₆₀₀ de 0.6.

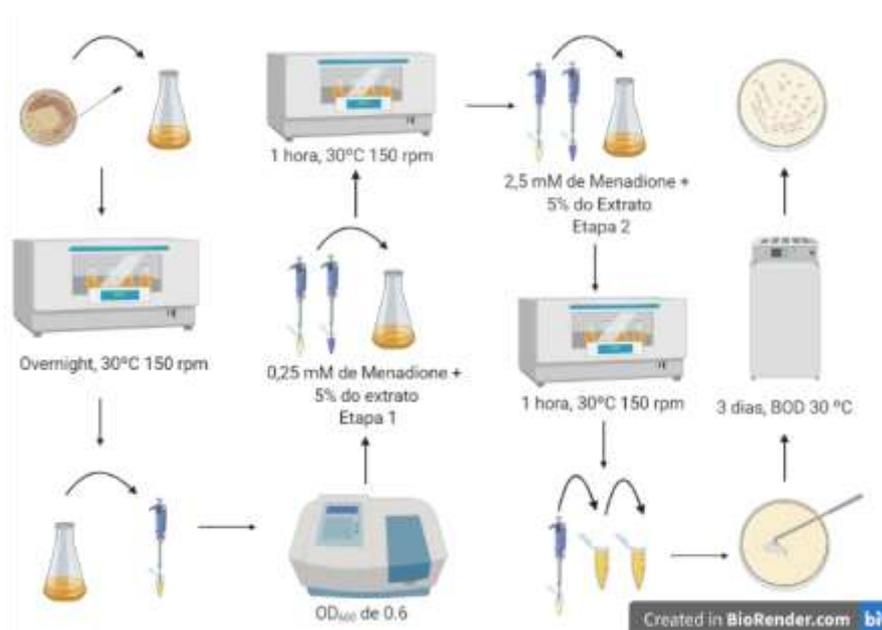
Para a realização dos desafios utilizou-se o agente estressor Menadione, compondo um grupo experimental de: 1- Controle (apenas meio de cultivo com as linhagens); 2- Controle com agente estressor (meio com linhagem + Menadione); 3- Tratamento (meio com linhagem + Menadione + substância de interesse). O desafio foi realizado em duas etapas, sendo a primeira etapa considerada um pré-tratamento, utilizando 0,25 mM de Menadione, agente estressor, seguida pela segunda etapa, com dosagem 10 vezes superior à primeira, utilizando-se uma concentração de 2,5 mM do mesmo.

Para os tratamentos propostos, foram utilizados conjuntamente ao agente estressor a substância de interesse, o extrato aquoso liofilizado de *Mucuna pruriens*, na concentração de 10% p/v, sendo portanto

dividida em 5% p/v na primeira etapa e 5% p/v na segunda. A concentração do extrato é baseada em seu peso após a liofilização, sendo este solubilizado em água estéril para posterior utilização no tratamento.

Após o preparo dos frascos com os devidos reagentes de cada condição experimental, os mesmos foram acondicionados em shaker a 30 °C e 150 rpm durante 1 hora cada etapa. No final da segunda etapa foram plaqueados 100 uL de cada frasco em placas de meio YPD e posterior incubação em BOD durante 3 dias para a visualização e contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) após os tratamentos. A metodologia descrita pode ser visualizada na Figura 1 abaixo.

Figura 1 – Metodologia tratamentos com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* PDI



Fonte: Autoria própria (2021).

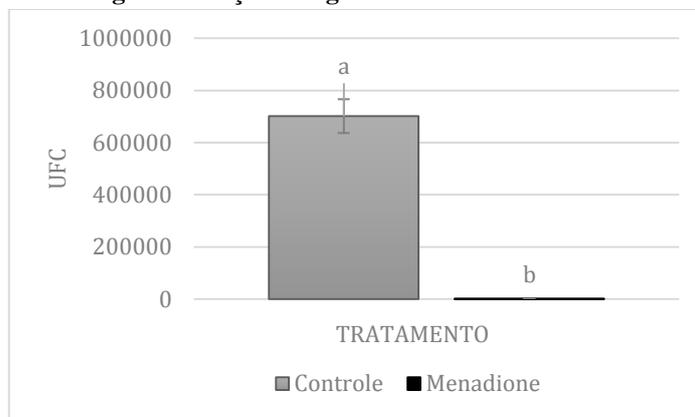
2.3 Análise estatística e discussão dos dados

As análises estatísticas dos dados foram realizadas por meio da utilização do software *Microsoft R Open* versão 3.5, sendo estes submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de *Tukey* a nível de significância de 0,05 garantindo 95% de confiabilidade dos resultados. Após a obtenção das análises, os resultados foram analisados, debatidos e correlacionados com estudos relatados na literatura.

3 RESULTADOS

Diante da metodologia anteriormente descrita obteve-se o extrato de semente de *Mucuna pruriens* liofilizado para a realização dos desafios com a linhagem *S. cerevisiae* PDI com estresse induzido pelo Menadione. Primeiramente avaliou-se se o agente estressor Menadione aumentou os níveis de radicais livres no meio ocasionando a morte celular da linhagem, sendo assim após os tratamentos avaliou-se a taxa de sobrevivência e plotou-se o gráfico observado na Figura 2 abaixo.

Figura 2 – Ação do agente estressor Menadione

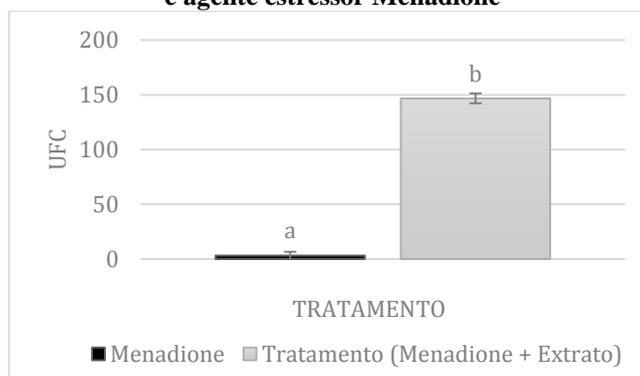


Fonte: Autoria própria (2021).

Como pode ser observado a ação do Menadione foi eficaz no aumento de radicais livres e consequentemente aumento da toxicidade da proteína alfa-sinucleína, ocasionando uma taxa de sobrevivência menor quando comparado com o Controle, sendo estes diferentes significativamente à 95% de confiabilidade.

Desta forma, avaliou-se por conseguinte a ação do extrato de semente de *Mucuna pruriens* à 10% p/v após as duas etapas de tratamento com o Menadione, para evidenciar sua ação perante a toxicidade da proteína alfa-sinucleína e estresse oxidativo induzido, após obtenção dos resultados plotou-se o gráfico observado na Figura 3 abaixo.

Figura 3 – Ação do extrato liofilizado de *Mucuna pruriens* perante proteína alfa-sinucleína e agente estressor Menadione



Fonte: Autoria própria (2021).

Como pode ser observado a ação do extrato de *Mucuna pruriens* foi eficaz no aumento da taxa de sobrevivência da linhagem perante a ação do agente estressor e toxicidade da proteína alfa-sinucleína, quando comparado com o ensaio com apenas o agente estressor, sendo estes diferentes significativamente à 95% de confiabilidade.

Desta forma evidencia-se que o extrato de *Mucuna pruriens* possui ação farmacológica correlacionada com a toxicidade de agregados proteicos de alfa-sinucleína e de radicais livres em altas concentrações, que ocasionam diversas disfunções nos organismos, sendo estas potencializadas com o envelhecimento e fatores externos.



4 CONCLUSÃO

Diante do exposto conclui-se com 95% de confiabilidade que o extrato de *Mucuna pruriens* teve eficácia na remediação danos celulares induzidos pela toxicidade da proteína alfa-sinucleína e do agente estressor Menadione.

O presente estudo salienta a importância do estudo do extrato de *Mucuna pruriens* como opção coadjuvante em tratamentos de doenças correlacionadas com o envelhecimento e formação de agregados proteicos, como por exemplo a doença de Parkinson, assim como a prospecção de novas substâncias naturais para implementação na medicina tradicional, além de evidenciar-se a viabilidade da utilização de modelos *in vivo* por meio de linhagens de *S. cerevisiae*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária e UTFPR pelo apoio e infraestrutura para pesquisa. Ao orientador Cleverson Busso por me guiar, ensinar e incentivar. Ao Prof. Dr. Mário Henrique de Barros do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP), por ceder as linhagens. Aos profissionais do laboratório e colegas que sempre estiveram presentes.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, I. G. S. **Relatório de estágio em Farmácia Hospitalar e monografia intitulada “Benefícios e riscos das plantas medicinais na Doença de Parkinson”**. 2018. Dissertação. Universidade de Coimbra, Coimbra, 2018. Disponível em: estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/84376/1/DOCUMENTO%20UNICOpdf.pdf. Acesso em: 20 jul. 2021.
- LIEU, C. A. *et al.* **A Water Extract of *Mucuna pruriens* Provides Long-Term Amelioration of Parkinsonism with Reduced Risk for Dyskinesias**. HHS Author Manuscripts, v.16, p. 458-465, 2010. Disponível em: ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2909380/. Acesso em: 20 jul. 2021.
- LONGHI, J. G. **Atividade biológica da semente de *Mucuna pruriens***. 2007. Dissertação. Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, Paraná, 2007. Disponível em: acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/13867/. Acesso em: 20 jul. 2021.
- PERFEITO, R.; REGO, A. C. **Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson**. Revista Neurociência, v.20, p. 273-284, 2012. Disponível em: periodicos.unifesp.br/index.php/neurociencias/article/view/8280/5811. Acesso em: 01 ago. 2021.
- SEGOVIA, V. C. **Agregação De Alfa-Sinucleína Na Doença De Parkinson: Importância Do Estresse De Retículo Endoplasmático**. 2018. Tese. UFPR, Curitiba, Paraná, 2018. Acesso em: 01 ago. 2021.
- TENREIRO, S.; OUTEIRO, T. F. **A levedura como modelo para estudar as bases moleculares da doença de Parkinson**. RBCEH, Passo Fundo, v. 12, n. 3, p. 288-298, set./dez. 2015. Disponível em: <http://seer.upf.br/index.php/rbceh/article/view/6006/pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- VIDAL, N. N. M.; SILVA-LOPEZ, R. E. ***Mucuna pruriens* (L.) DC (Leguminosae)**. Revista Fitos, Manguinhos, Rio de Janeiro, v. 05, n. 03, set. 2010. Disponível em: arca.fiocruz.br/bitstream/icict/15843/2/32.pdf. Acesso em: 20 jul. 2021.
- ZAMPOL, M. A. **Efeito de antioxidantes naturais em modelos parkinsonianos de *Saccharomyces cerevisiae***. 2015. Dissertação. USP, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-24052014-122243/pt-br.php>. Acesso em: 20 jul. 2021.