Estudo do potencial protetor da coenzima Q_{10} em uma linhagem modelo parkinsoniana de *Saccharomyces cerevisiae*

Study of the protective potential of coenzyme Q10 in a parkinsonian model strain of Saccharomyces cerevisiae

Priscila Souza[*], Cleverson Busso[£], Letícia Scussel Farias[¥]

RESUMO

A coenzima Q10 é uma molécula com reconhecida atividade antioxidante intraocular regenerável e bioenergética presente na mitocôndria da célula humana. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos microrganismos mais utilizados como modelo de estudo de outros organismos e suas interações, devido sua fácil manipulação, similaridade e genoma bem caracterizado; Portanto, a utilização da *S. cerevisiae*, para a obtenção de mutantes torna-se viável e almejado para o estudo *in vivo*. Foi feito a determinação da concentração do agente estressor Menadione (Vitamina K3), onde os tratamentos foram realizados em duas etapas, onde a primeira é um pré-tratamento com uma dosagem 10 vezes inferior a segunda etapa. Posteriormente, foi realizado o tratamento avaliando a atividade antioxidante da coenzima Q10 com *S. cerevisiae*. Os resultados mostra que a coenzima Q10 não teve diferença significativa, quando comparado com o Menadione, faz-se necessário maiores estudos quanto a ação antioxidantes da coenzima Q10.

Palavras-chave: coenzima Q10, antioxidante, menadione, tratamento

ABSTRACT

Coenzyme Q10 is a molecule with recognized intraocular regenerable and bioenergetic antioxidant activity present in human cell mitochondria. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most used microorganisms as a model for studying other organisms and their interactions, due to its easy handling, similarity and well-available genome; Therefore, the use of *S. cerevisiae* to obtain mutants becomes feasible and desired for *in vivo* study. The concentration of the stressor agent Menadione (Vitamin K3) was determined, where the treatments were carried out in two stages, where the first is a pre-treatment with a dosage 10 times lower than the second stage. Subsequently, the treatment was carried out evaluating the antioxidant activity of coenzyme Q10 with *S. cerevisiae*. The results show that coenzyme Q10 had no difference when compared to Menadione, further studies are needed regarding the antioxidant action of coenzyme Q10.

Keywords: oenzyme Q10, antioxidant, menadione, treatment.

[*] Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil; prisou@alunos.utfpr.edu.br
[£] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil; cleversonbusso@utfpr.edu.br (Orientador)
[¥]Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo, Paraná, Brasil; letisf27@gmail.co

1 INTRODUÇÃO

A coenzima Q_{10} (2,3 dimetoxi-5-metil-6-decaprenil benzoquinona), conhecida também como ubiquinona, é uma molécula solúvel em lipídios que apresenta um anel quinona ligado a uma cadeia poliprenil desempenhando funções redox (SPINDLER, et al 2009). É uma molécula com reconhecida atividade antioxidante regenerável, presente na mitocôndria de células humanas e encontrada em maiores concentrações principalmente no cérebro, coração, rins e tecido hepático (JACOBS, et al 2020; AYDOĞAN, 2013).

A Coenzima Q_{10} (CoQ10) é sintetizada pelas células do corpo humano, mas também pode ser obtida através da ingestão de alimentos. Ela é encontrada em pequenas quantidades em cereais, ovos, frutos secos, produtos lácteos, vegetais, carne vermelha, peixe e aves que são fontes ricas CoQ10. Além disso, é comercializada como suplemento alimentar e utilizada em formulações cosméticas. (JACOBS, et al 2020; AYDOĞAN, 2013)

Devido as propriedades antioxidantes exercida pela CoQ10, esta molécula tem sido utilizada como suplemento para melhorar a performance durante o exercício físico de atletas. Também é utilizada como coadjuvante para melhorar as funções cerebrais, retardar o envelhecimento precoce e na prevenção de doenças cardiovasculares. A capacidade antioxidante de um composto se dá por sua capacidade de doar elétrons para outra molécula (radical livre) possibilitando que esta se estabilize (DORNAS,2007). Há relatos que doenças neurodegenerativas apresentam índices elevados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), sendo assim há a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante da coenzima Q10 em diferentes modelos biológicos que apresentam características bioquímicas da doença.

A levedura *S. cerevisiae* é um dos microrganismos mais utilizados como modelo de estudo de doenças humanas, principalmente aquelas associadas com EROs. Este microrganismo apresenta inúmeros genes homólogos/ortólogos com a espécies humana, além disso, é de fácil manipulação e apresenta um genoma bem caracterizado (MONTEIRO,2006). Portanto, utilizando-se ferramentas de técnicas de DNA recombinante, foi possível desenvolver a linhagem PD1 expressando a α-sinucleína, uma proteína de 140 aminoácidos cuja agregação aumenta o estresse oxidativo e desencadeia falhas no sistema bioenergético. O acúmulo de agregados dessa proteína insolúvel (corpos de Lewi) tem sido associado ao mal de Parkinson.

Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade regenerativa e antioxidante da CoQ10 através da contagem de células viáveis de uma linhagem de *S. cerevisiae* expressando α-sinucleína associada ao mal de Parkinson. A avaliação da capacidade da CoQ10 reverter a morte celular induzida por um agente estressor e expressando a α-sinucleína, pode trazer novos conhecimentos sobre o efeito protetor dessa substância em condições letais para a célula de levedura.

2 METODOLOGIA

2.1 Linhagem PD1 de *Saccharomyces cerevisiae*

A linhagem PD1 utilizada neste experimento foi gentilmente cedida pelo professor Mário Henrique de Barros do laboratório de Biogênese Mitocondrial do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

2.2 Indução do estresse oxidativo mediante uso do agente estressor Menadione (Vitamina K3)

Muitos estudos apontam que o estresse oxidativo desencadeia um papel chave na manifestação da doença de Parkinson, e o aumento dos níveis de α-sinucleína causaria disfunção mitocondrial com consequente aumento do estresse oxidativo. Desta forma, para avaliar o estresse oxidativo da célula PD1 e o efeito protetor da CoQ10, foi utilizada o menadione, um precursor da vitamina K e reconhecido agente estressor mitocondrial.

Para a determinação da concentração e efeito da Menadione, utilizada como agente estressor nos ensaios, realizou-se os desafios/tratamentos nas concentrações de 0,2 mM (etapa 1) e 2,0 mM (etapa 2) e nas concentrações de 0,25mM (etapa 1) e 2,5mM (etapa 2) do composto. Ou seja, os tratamentos foram realizados em duas etapas, onde a primeira é um pré-tratamento com uma dosagem 10 vezes inferior a segunda etapa. Inicialmente foi realizado o cultivo da linhagem de *S. cerevisiae* em overnight em meio YPD mantidas a 28 ºC com agitação orbital de 150 rpm, por 24 horas. Após este período as células foram ajustadas em OD_{600} de 0.6 e então iniciou-se o tratamento com a etapa 1. Na etapa 1, adicionou-se a concentração do pré-tratamento e manteve a linhagem + agente estressor nas condições ideais de crescimento durante 1 hora, após este período adicionou-se uma dosagem 10x superior de Menadione (etapa 2), mantendo por mais 1 hora nas condições ideais de crescimento. Logo após, plaqueou-se os ensaios em meio de cutura YPD sólido e as placas foram incubadas na BOD a 30 ºC por 3 dias para posterior contagem de células sobreviventes ao tratamento.

2.3 Tratamento de *Saccharomyces cerevisiae com CoQ10*

Após a determinação da concentração apropriada do agente estressor, realizou-se o tratamento da linhagem PD1 na presença de manadione + CoQ10. A linhagem PD1 foi incubada em overnight em meio YPD a 28 ºC com agitação orbital de 150 rpm por 24 horas. Após este período as células foram ajustadas em OD_{600} de 0.6.

A CoQ10 foi resuspendida em 1mL de etanol (concentração 100mg/mL) e os tratamentos seguiram em duas etapas, como descrito anteriormente, contendo, portanto, a linhagem a ser desafiada + agente estressor + composto potencialmente antioxidante. Os primeiros ensaios utilizaram 0,2 mM (etapa 1) e 2 mM (etapa 2) de menadione e posteriormente foi realizado o tratamento com 0,25 mM (etapa 1) e 2,5 mM (etapa 2) de Menadione. Tanto na etapa 1 como na etapa 2, foram adicionados 150 µL de CoQ10, resultando em 300 µL (1mM) na concentração final. Após concluir as duas etapas do tratamento plaqueou-se 100 µL das amostras em meio YPD sólido, apenas na amostra controle realizou-se diluição 10^{-3} para facilitar a contagem de UFC. As placas foram mantidas na BOD por 3 dias a 30 ºC. Após o crescimento celular, realizou-se a contagem de UFC presente nas placas e comparou-se o efeito antioxidante/protetor da CoQ10.

2.4 Análise estatística

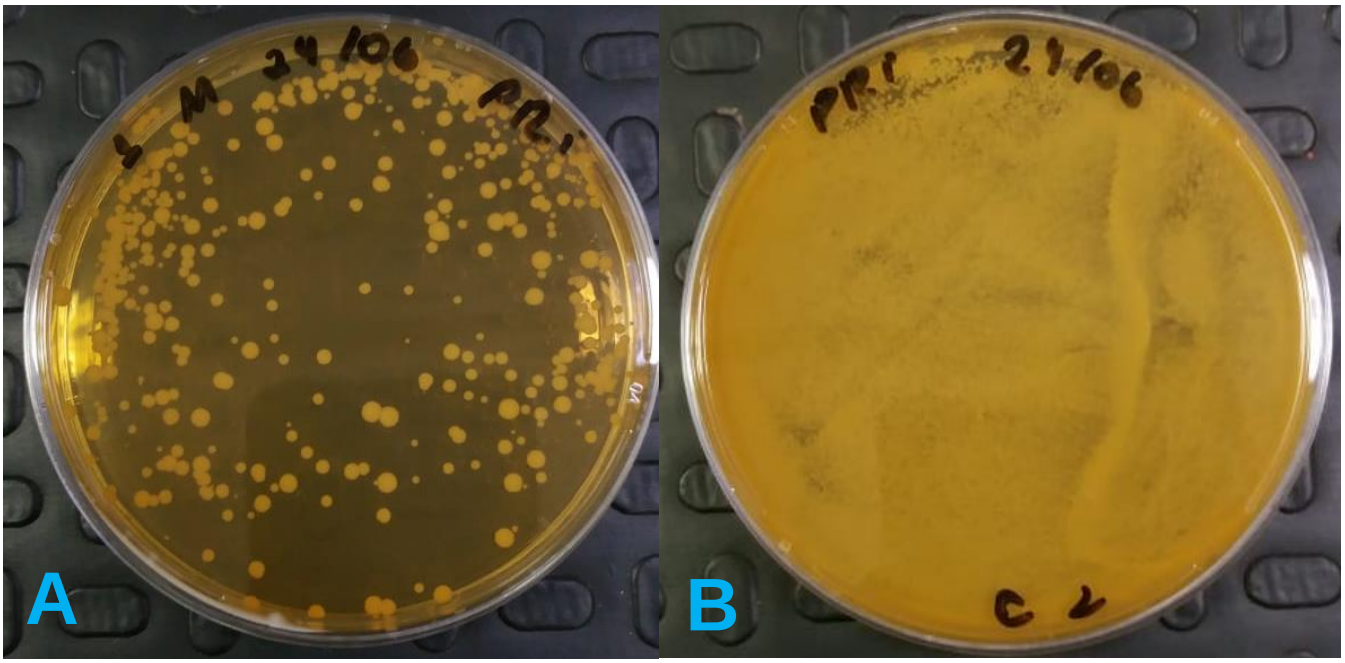
A análise estatística empregada foi o teste "*t" de Student* não-pareado, através do programa *GraphPad Prism software*, versão 4.00. Foram realizadas, no mínimo, 3 repetições nos experimentos.

3 RESULTADOS

3.1 Ação do agente estressor Menadione (Vitamina K3) sobre as linhagens de *S. cerevisiae*

De acordo com Laux et al, (2001) o Menadione, é um composto orgânico com propriedades citotóxicas, conhecida pela indução de apoptose e morte celular. Essa substância afeta de modo direto a função mitocondrial da célula, tornando-se um indutor de estresse oxidativo em altas dosagens. Na Figura 1A é possível observar o efeito citotóxico do menadione na concentração de 2,5mM, sugerindo um alto índice de morte celular quando comparado ao grupo controle sem a presença do composto (Figura 1B).

Figura 1- Avaliação do crescimento de UFC da linhagem de *S. cerevisiae* PD1 (A) Após etapa 2 do tratamento com Menadione à 2,5mM (10^0) e (B) Amostra controle (10^{-3})



Fonte: Autor próprio, 2021

3.2 Tratamento com a *Saccharomyces cerevisiae*

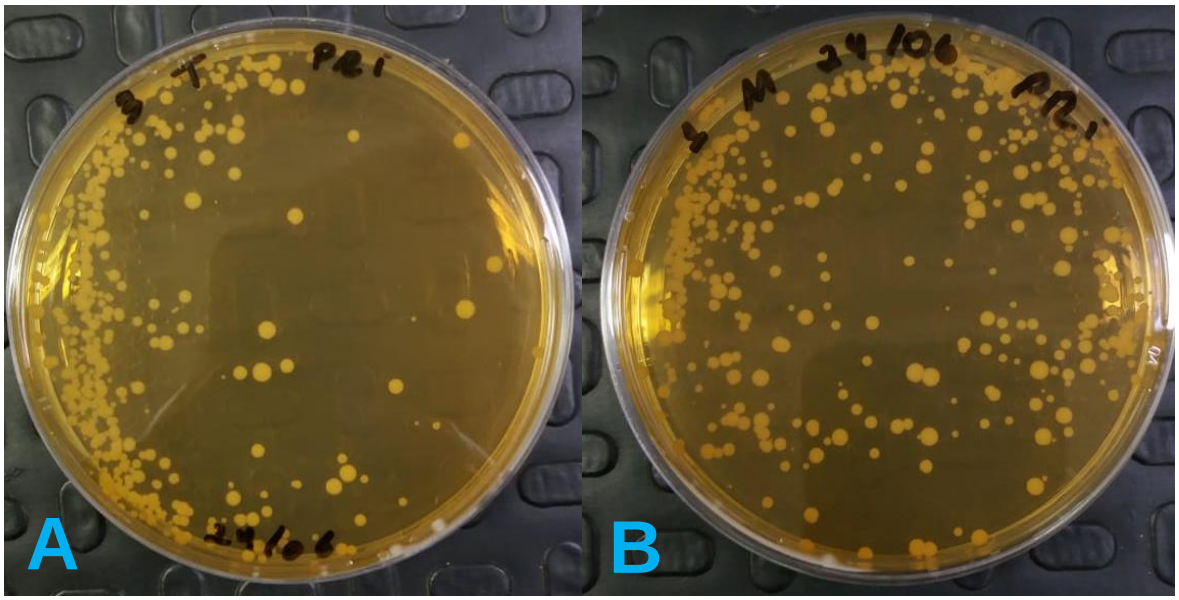
Para avaliar o efeito protetor da CoQ10 sobre células cultivadas na presença do agente estressor, utilizou-se uma concentração final de 1,0mM da coenzima em meio de cultura. De acordo com a Figura 2 é possível observar que a CoQ10 teve pouco efeito quanto ao aumento da viabilidade celular em células tratadas com Menadione.

Quando se compara o número de células viáveis considerando placas contendo somente o agente estressor e placas contendo o agente estressor + CoQ10, observa-se um média de 397 e 347 células respectivamente. Aplicando-se um teste estatístico comparativo (teste t), não foi observado um efeito significativo da CoQ10 quando a capacidade de aumento da viabilidade celular na presença do agente estressor (Figura 3).

Os resultados indicam preliminarmente que a concentração de 1mM de Coenzima Q10 não foi capaz de reverter o efeito estressor promovido pelo menadione. Moléculas de CoQ com cadeia isoprenóide menor são mais eficientes na prevenção de peroxidação da membrana celular quando comparadas a homólogos de cadeia

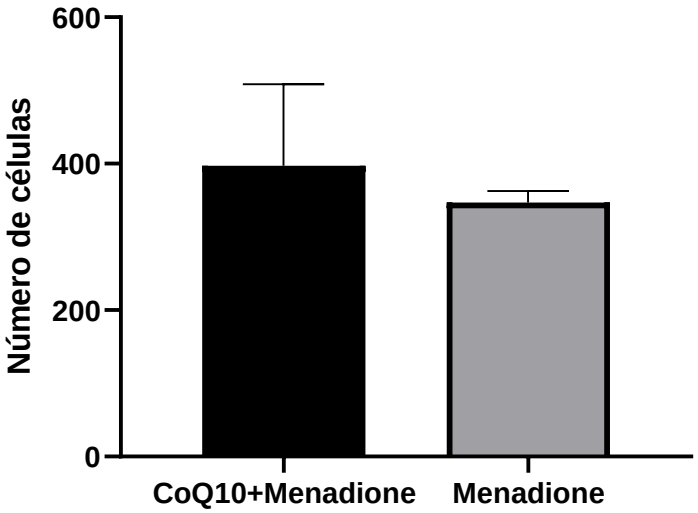
longa, indicando que o efeito é dependente do tamanho da cadeia (ERNSTER E DALLNER, 1995). CoQ_{10} é uma molécula altamente hidrofóbica o que tem dificultado sua administração em meio aquoso (NAKASHIMA et al., 2002). A administração de 10mg/kg da forma solubilizada ou em pó em ratos, atinge a concentração máxima no plasma sanguíneo após 3-4 horas, sendo que sua absorção é facilitada com a formulação do composto com lipídeos (KALENIKOVA et al., 2008). O etanol utilizado na solubilização da CoQ10 também não afeta a viabilidade celular, uma vez que foi utilizado um volume final de etanol de 1% quando a linhagem é capaz de tolerar até 11% (LUONG, 1985).

Figura 2- Avaliação do crescimento de UFC da linhagem de *S. cerevisiae* PD1 após a etapa 2 do tratamento (A) Menadione + Coenzima Q10 (diluição: 10^0) (B) Menadione (diluição: 10^0)



Fonte: Autor próprio, 2021

Figura 3- Número de células viáveis a presença do Menadione e Menadione + Coenzima Q10. Test t, valores não foram significativos para $p \leq 0,05$



Fonte: Autor próprio,2021

4 CONCLUSÃO

A CoQ10 na concentração de 1mM não foi capaz de proteger o efeito estressor induzido pelo composto Menadione (2,5mM) e nem reverter os danos promovidos pela expressão da alfa-sinucleína. Uma hipótese é a hidrofobicidade do composto bem como o tamanho de sua molécula que é constituída de dez unidades de isoprenos, o que poderia interferir no acesso intracelular. Os resultados aqui apresentados são preliminares necessitando de novos ensaios inclusive com novas concentrações e até mesmo um novo solvente. Infelizmente não foi possível complementar esses resultados em razão da pandemia COVID-19 ocorrida durante o período de realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UTFPR pelo apoio e infraestrutura para pesquisa. A Fundação Araucária pela bolsa de estudos. Ao meu orientador Professor Dr. Cleverson Busso por me guiar, ensinar e incentivar.

REFERÊNCIAS

AYDOĞAN. F. A coenzima Q10 produz efeito sobre a prevenção da miringoesclerose?: Estudo experimental com ratos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**.2013. Disponível em:< https://www.scielo.br/j/bjorl/a/9hckYXG5WPxJ6YxXsZfws4q/?lang=pt>

DORNAS, W.C., OLIVEIRA, T.T., RODRIGUES-DAS-DORES, R.G., SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides:potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** V. 28, n.3, p. 241- 249, 2007

ERNSTER, L AND DALLNER, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. **Biochim. Biophys. Acta** 1271:195-204, 1995.

JACOBS, M.A.P., ACCURSIO, W. **Coenzima Q10: Aplicações clínicas.** BWS Journal. 2020 Novembro. Disponivel em:< file:///C:/Users/aluno/Downloads/129-Texto%20do%20artigo-423-1-10-20201130.pdf>

KALENIKOVA, E. I.; GORODETSKAYA, E. A.; MEDVEDEV, O. S. Pharmacokinetics of coenzyme q10. **Bull Exp. Biol. Med**. v. 146, p. 313-316, 2008.

LAUX , A NEL. Evidências de que a apoptose induzida por estresse oxidativo pela menadiona envolve vias dependentes de Fas e independentes de Fas. Elsevier, **Imunologia Clínica** Volume 101, Edição 3 , Dezembro de 2001 , Páginas 335-344

LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnol. Bioeng**. 27, 280–285, 1985.

MONTEIRO, A.R.S. **Uso de Saccharomyces cerevisiae para estudo de organismos procariotos**. Departamento de Biologia Geral Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais 2006

NAKASHIMA, Y.; SHINZAWA-ITOH, K.; WATANABE, K.; NAOKI, K. Steady-State kinetics of NADH:coenzyme Q oxidoreductase isolated from bovine heart mitochondria. **J. Bioenerg. Biomembr**., v. 34, p. 11-19, 2002.

SPINDLER, M., BEAL, M.F., HENCHCLIFFE, C. **Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease**. A review. Neuropsychiatric Disease and treatment, Albany. 2009. Disponível em:< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2785862/>