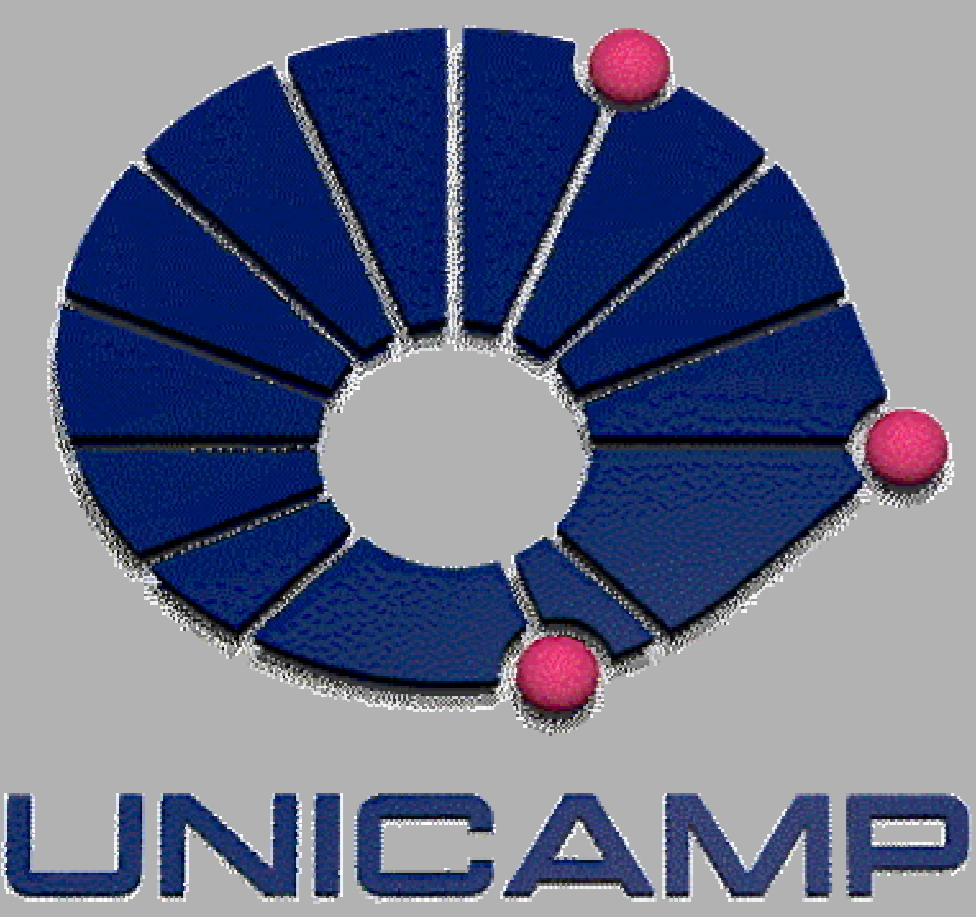


AValiação do efeito de extratos etanólico e hexânico de *Alternanthera maritima* sobre a bioenergética mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*



¹Fabretti, D. C., ¹Silva, T. M., ²Salvador, M. J. & ¹Gadelha, F. R.

¹Departamento de Bioquímica, ²Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP

Agências financiadoras: Capes, SAE/Unicamp

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi* – *Alternanthera maritima* – mitocôndria

debora_fabretti@yahoo.com.br

Introdução

A busca por novas terapias contra a doença de Chagas se faz necessária devido à sua alta prevalência na América Latina à falta de um tratamento eficaz. A grande diversidade da flora brasileira pode fornecer compostos bioativos para o desenvolvimento de novos fitoterápicos.

Alternanthera maritima pertence à família Amaranthaceae, que possui algumas espécies com importância medicinal. Extratos pertencentes à essa família já demonstraram promissores efeitos contra bactérias e fungos e demonstrou atividade na viabilidade celular de *Leishmania amazonensis* formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Objetivo

Analisar os efeitos de extratos brutos etanólico e hexânico provenientes de raízes e partes aéreas de *A. maritima* sobre a bioenergética mitocondrial de *T. cruzi*.

Metodologia

1) Obtenção dos extratos brutos de *A. maritima*:

Os extratos brutos foram obtidos de raízes (extratos hexânico e etanólico, AMRH e AMRE, respectivamente) e partes aéreas (extratos hexânico e etanólico, AMPAH e AMPAE, respectivamente) de *A. maritima*, como descrito anteriormente (SOUZA et al., *Z. Naturforsch.* (2007) 62c: 339-347).

2) Cultura de células:

Epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivados em meio LIT na presença ou não (controle) de concentrações subletais dos extratos. Após 4 dias de crescimento, células foram coletadas por centrifugação, lavadas com PBS e ressuspendidas em meio de reação padrão (125 mM sacarose, 5 mM de KCl, 2 mM de KH₂PO₄, 0,5 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES, pH 7,2, 1 mM de EGTA e 0,1% de BSA).

3) Determinação dos valores de IC₅₀:

1x10⁷ céls/mL foram cultivadas em meio LIT na presença de concentrações crescentes de AMPAE, AMPAH, AMRE e AMRH (utilizou-se DMSO nas células controle). Após 4 dias de crescimento (fase log) o número de células foi determinado utilizando-se câmara de Neubauer. Os valores de IC₅₀ foram calculados utilizando-se o software Origin 6.0.

4) Consumo de Oxigênio:

5x10⁷ céls/mL foram incubadas em meio de reação padrão e o consumo de oxigênio determinado em um ígrom Clark-type (Hansatech® Systems, Norfolk, Eng.) com temperatura controlada na presença de 5 mM de succinato e 40 µM de digitonina.

5) Potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ):

O ΔΨ foi determinado nas condições do item 2 utilizando-se um fluorímetro (F-4500, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) na presença de safranina (5 mM), 5mM succinato e 40 µM de digitonina operando nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 e 586 nm, respectivamente.

6) Análise estatística

Dados representam médias ± desvio padrão de pelo menos cinco experimentos diferentes feitos em duplicata. Análises foram feitas utilizando-se o Student's *t*-test, através do software Origin 6.0 (*p* < 0,05 foram considerados significativamente diferentes).

Resultados e discussão

Tabela 1: valores de IC₅₀ para epimastigotas de *T. cruzi*.

Extrato	IC ₅₀ (mg/mL)
AMRH	1,67
AMRE	10,34
AMPAH	3,42
AMPAE	0,83

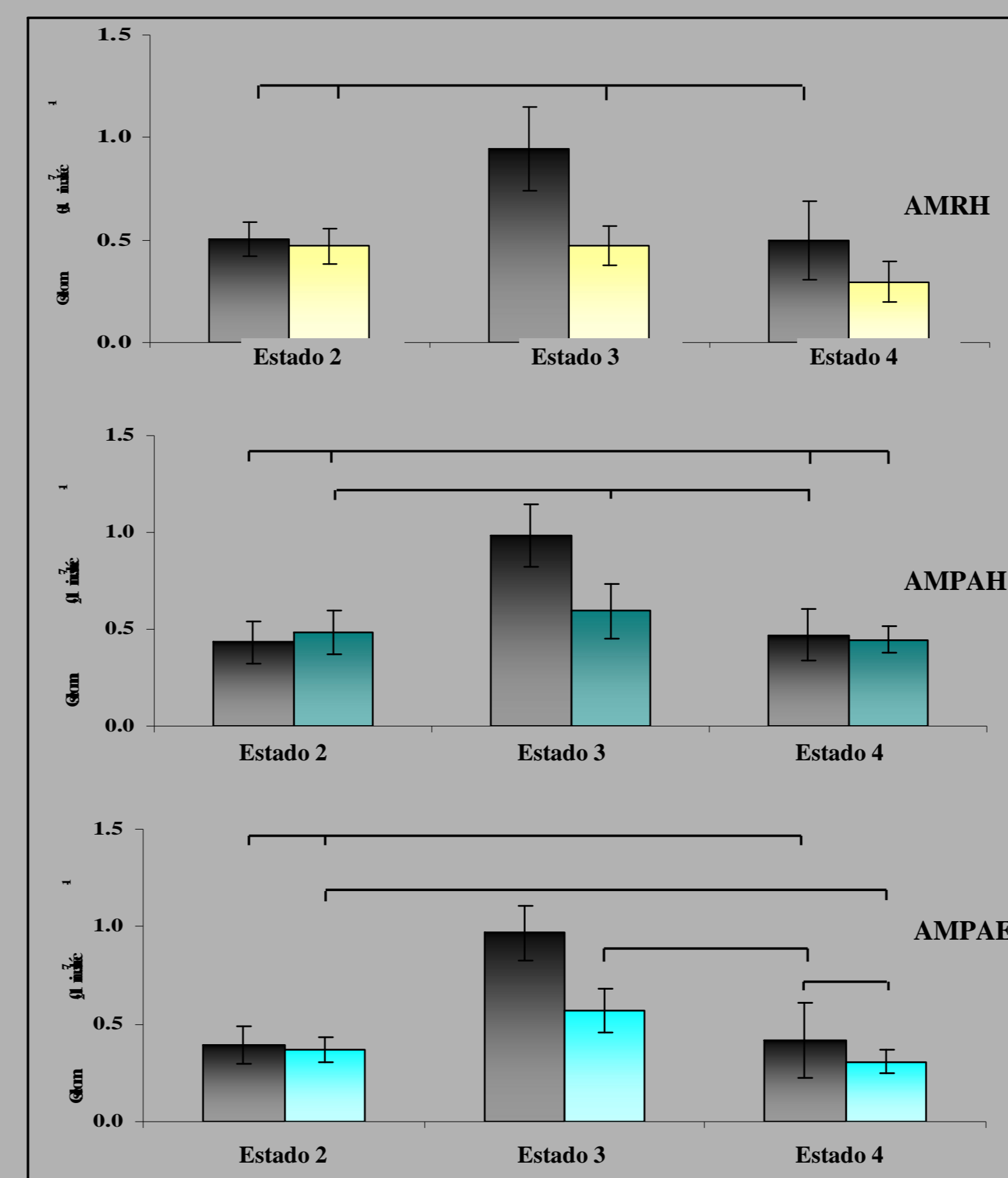


Figura 1: Taxas de consumo de oxigênio de *T. cruzi* na presença dos extratos. 5x10⁷ céls/mL foram incubadas como descrito na Metodologia e o consumo de oxigênio foi medido em células controle (barras pretas) e células tratadas (barras coloridas). As taxas foram determinadas na presença de: succinato (Estado 2), 40 µM de ADP (Estado 3) e 2 µg/mL de oligomicina (Estado 4). Análise estatística (*t*-test): *p* > 0,05, para os grupos indicados.

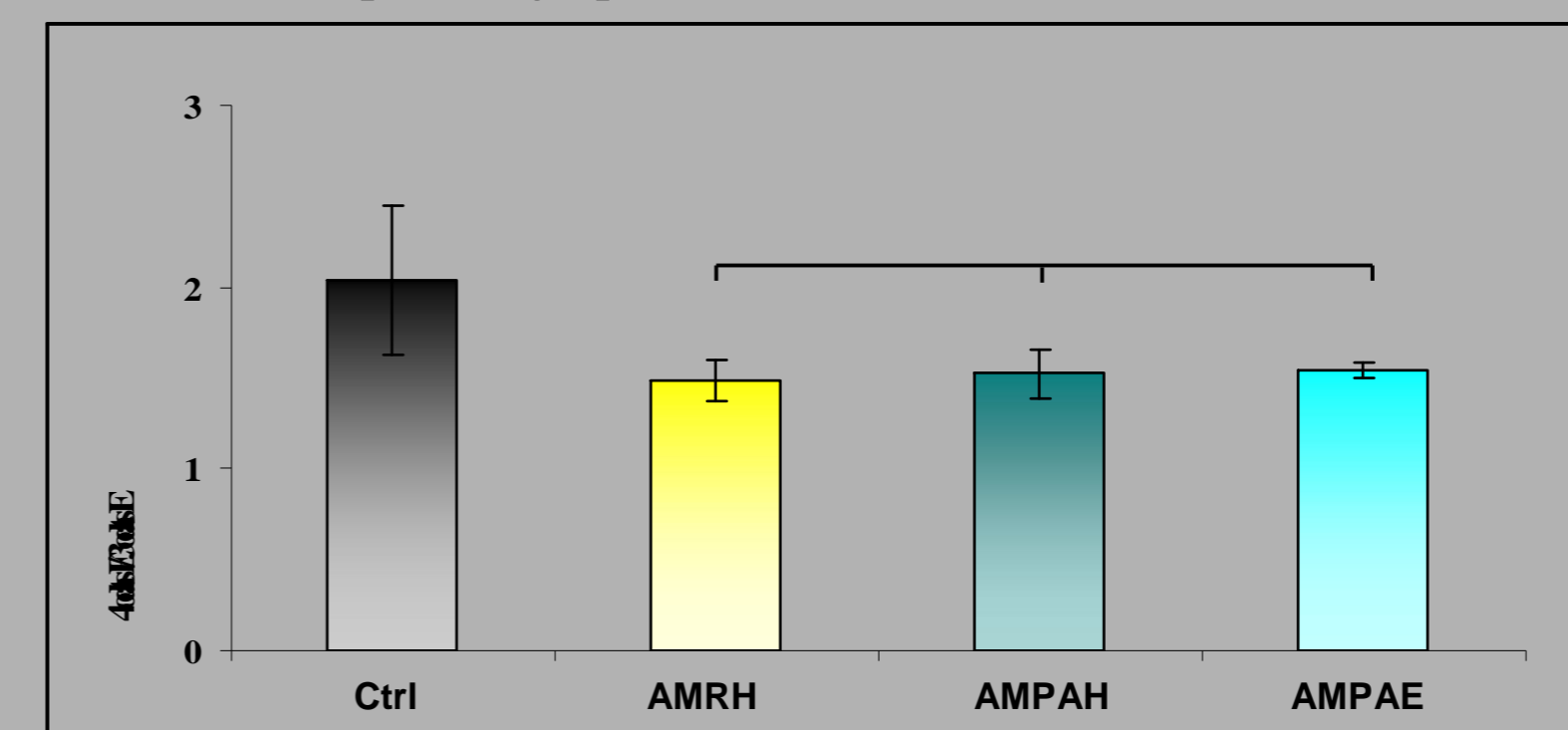


Figura 3: Efeito dos extratos no controle respiratório de *T. cruzi*. As condições experimentais foram as mesmas da Figura 1. Estado 3/Estado 4: consumo de oxigênio na presença de 40 µM de ADP (Estado 3) / consumo de oxigênio na presença de 2 µg/mL de oligomicina (estado 4). Análise estatística: *p* > 0,05 para os grupos indicados.

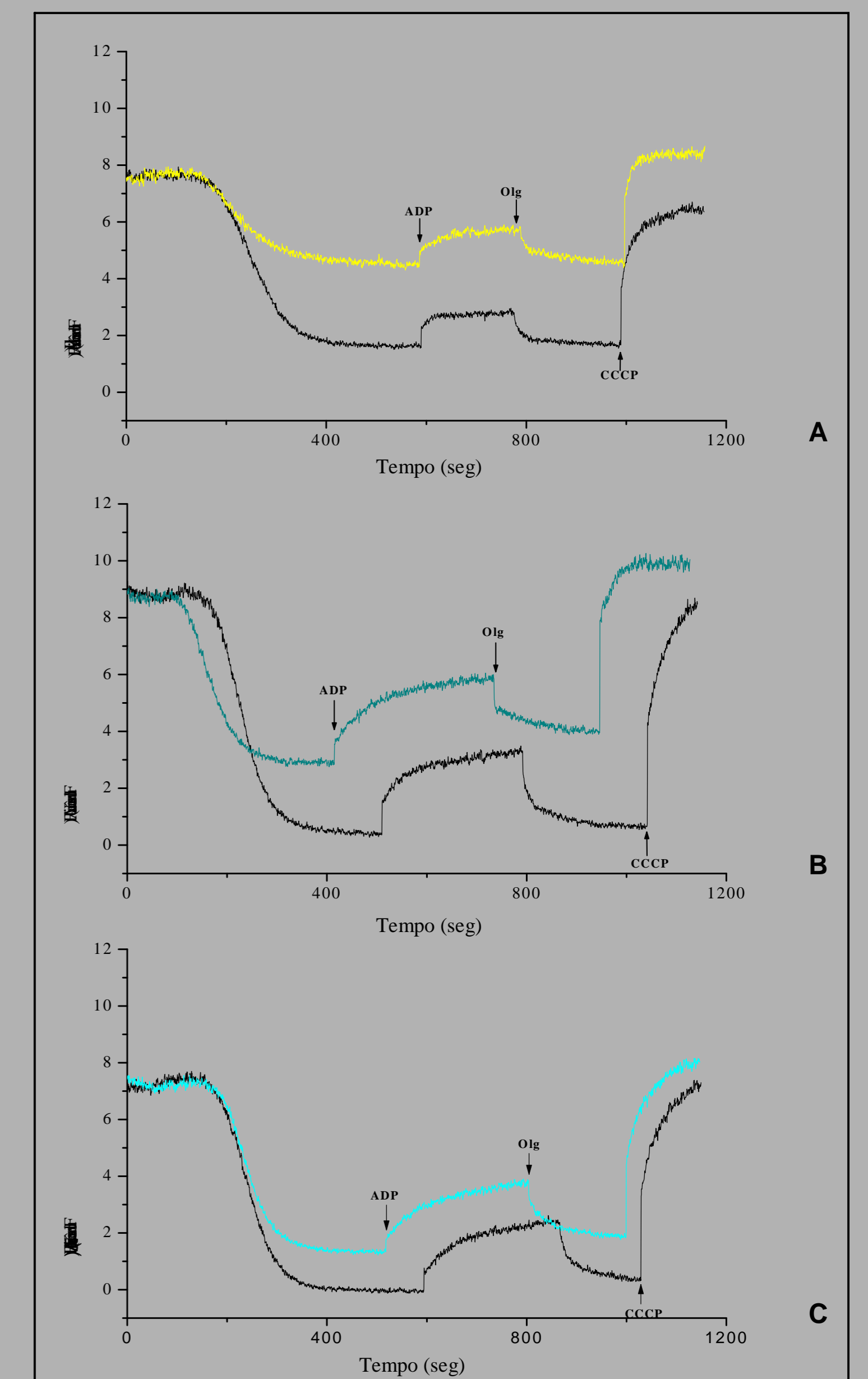


Figura 2: Potencial de membrana mitocondrial de *T. cruzi*. 5x10⁷ céls/mL foram incubadas com descrito na Metodologia na presença ((A) AMRH, (B) AMPAH ou (C) AMPAE) ou não (células controle, linhas pretas) dos extratos. ADP (400 µM), Olig (2 µg.mL⁻¹) e CCCP (µM) foram adicionados nos locais indicados.

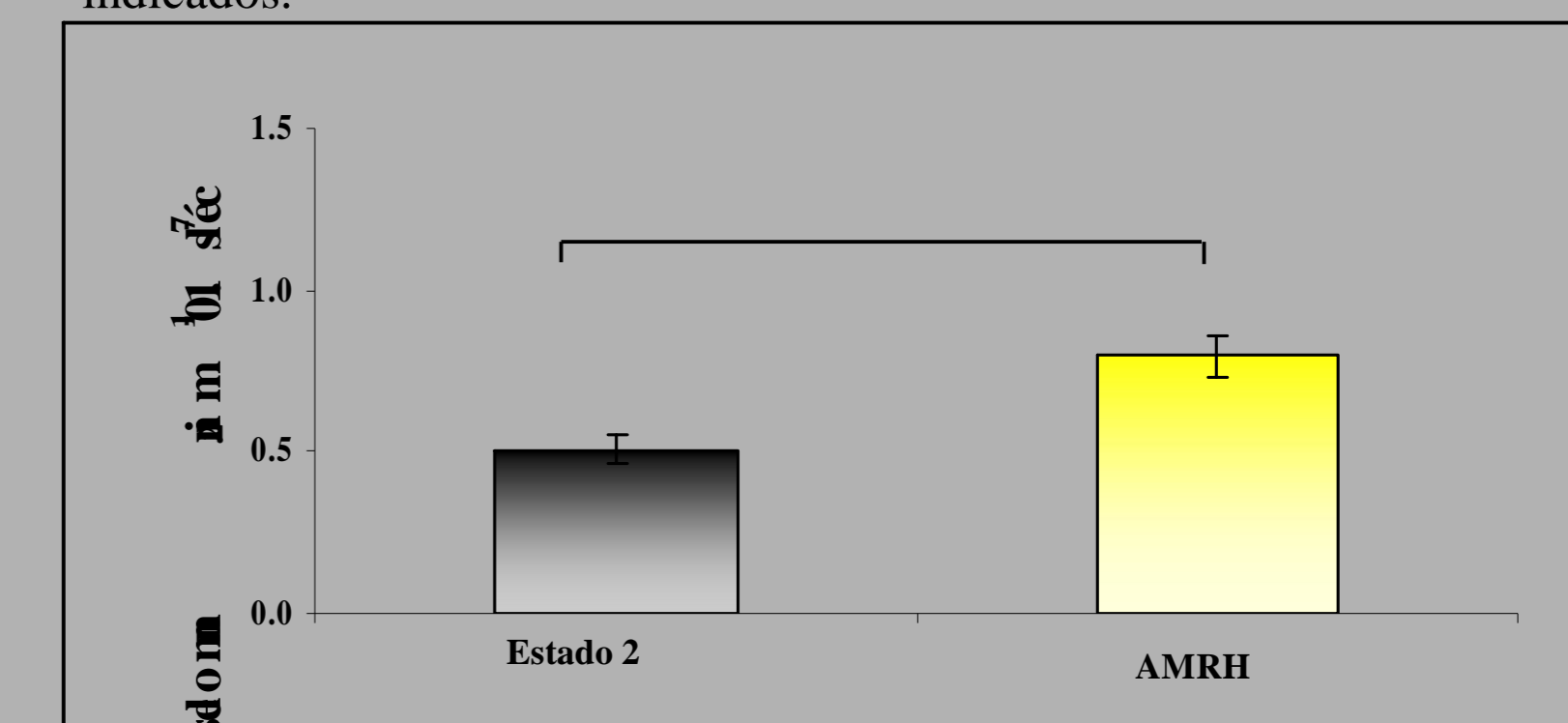


Figura 4: Efeito da adição direta de AMRH no consumo de oxigênio de epimastigotas de *T. cruzi*. As condições experimentais foram as mesmas na Figura 1. Análise estatística (*t*-test): *p* < 0,05.

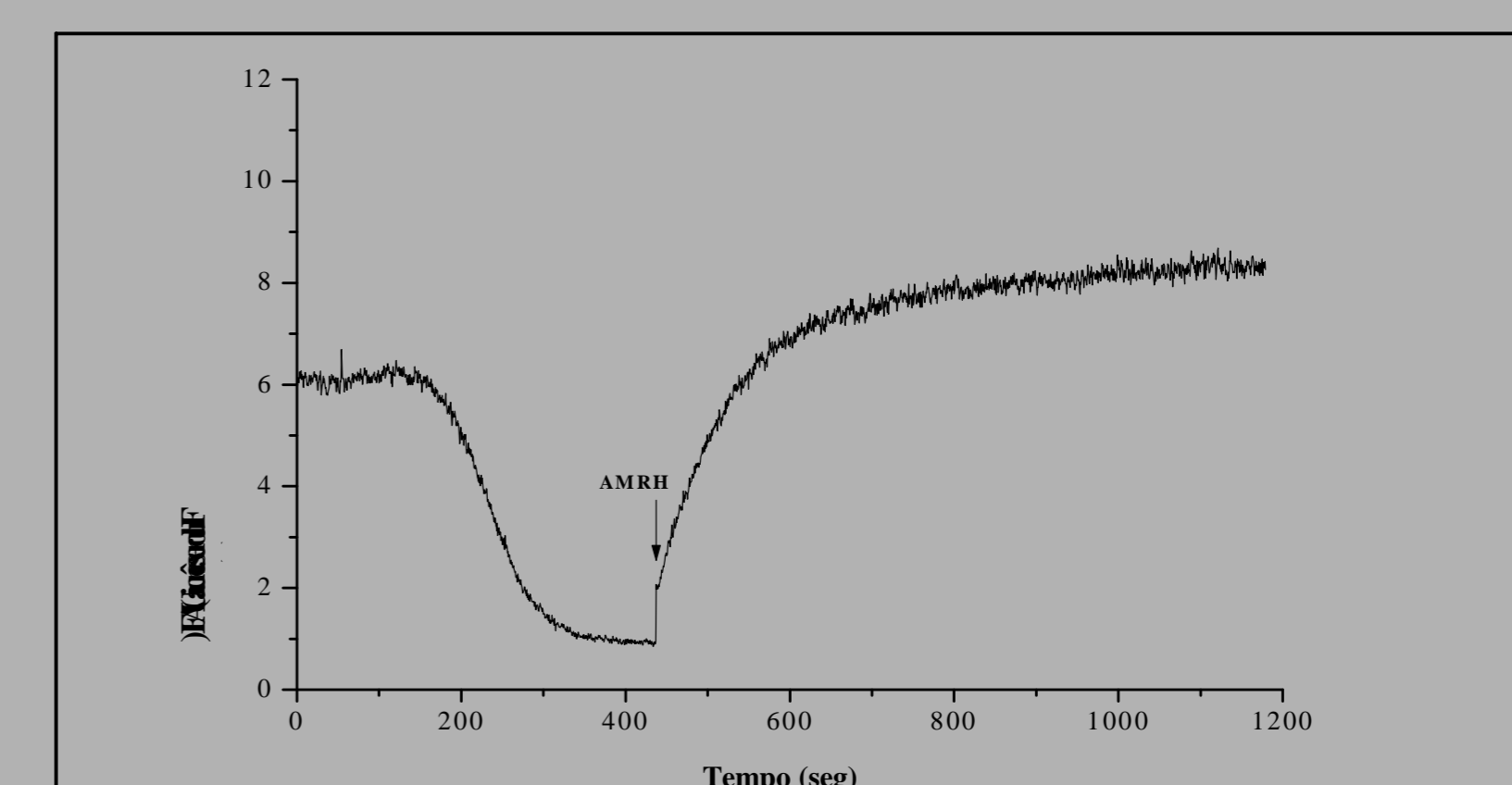


Figura 5: Efeito da adição direta de AMRH no potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ) de epimastigotas de *T. cruzi*. As condições experimentais foram as mesmas na Figura 2.

Conclusão

Os efeitos dos extratos brutos de *A. maritima* na bioenergética mitocondrial de *T. cruzi* foram evidentes, tanto no consumo de oxigênio como no ΔΨ. O extrato AMRH foi o que mostrou mais efetivo. Experimentos estão em andamento para desvendar o mecanismo de ação destes compostos.