

NATÁLIA CARDOSO SANTOS

AVALIAÇÃO DA AÇÃO AGONISTA NO RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR) DE
DROGAS VEGETAIS CONSTANTES NA RDC 10/10 DA ANVISA

BRASÍLIA, 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NATÁLIA CARDOSO SANTOS

AVALIAÇÃO DA AÇÃO AGONISTA NO RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR) DE
DROGAS VEGETAIS CONSTANTES NA RDC 10/10 DA ANVISA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo
programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof.Dr. Luiz Alberto Simeoni

Co-orientadora: Profa. Dra. Marie Togashi

BRASÍLIA

2012

NATÁLIA CARDOSO SANTOS

Avaliação da ação agonista no receptor do pregnano X (PXR) de drogas vegetais constantes na RDC 10/10 da Anvisa

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 13 / 07 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni – (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves
Universidade de Brasília

Dra. Camila Fracalossi Redigueri
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Dra. Ana Cecília Bezerra Carvalho
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Dedico este trabalho aos meus pais Sena e Dilma, aos meus irmãos André e Eduardo e à minha filha Mariana. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos e ter me dado coragem e persistência no desenvolvimento deste estudo.

Aos meus pais Sena e Dilma por sempre acreditarem que sou capaz e por nunca terem medido esforços para que meus sonhos tornassem realidade.

Aos meus irmãos André pelo apoio e incentivo e Eduardo por ser meu porto seguro em todas as situações de minha vida.

À minha amada filha Mariana, pela sua presença em minha vida e por compreender minha ausência em vários momentos importantes.

À minha avó (*in memoriam*) Alexandrina por sempre me acompanhar e proteger.

A todos da minha família que contribuíram para realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni pelos ensinamentos, compreensão e apoio durante toda essa trajetória de pesquisa.

À professora Dâmaris Silveira, professora Marie Togashi e professor Francisco Neves pelo conhecimento transmitido que contribuíram significativamente no processo de desenvolvimento deste trabalho.

À Cristina Simeoni e Rilva Soares pela ajuda em todos os momentos que precisei.

Às amigas Lia Nara e Beatriz Araújo pelo apoio e toda a ajuda prestada para realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia molecular que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Aos amigos da Universidade Federal do Maranhão, professora Dra. Denise Fernandes Coutinho Moraes, Clarice Noletto, Klinger Rodrigues, Bruno Araújo Serra Pinto pelo incentivo de seguir o caminho da pesquisa, carinho e desejo de sucesso.

À instituição, CAPES, pelo auxílio financeiro na realização da pesquisa.

Ao Decanato de Pós-Graduação da Universidade de Brasília pelo apoio financeiro de parte deste trabalho

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Receptores nucleares, tais como PPAR, GR, TR, ER e PXR, estão relacionados a diversos processos biológicos. Diversos ligantes sintéticos e naturais possuem a capacidade de ativá-los ou reprimi-los influenciando diretamente sua maquinaria transcricional. O receptor de pregnanos X (PXR), em especial, exerce função crucial na homeostase de metabolização e eliminação de endobióticos e xenobióticos por meio da regulação de enzimas do citocromo P450, especialmente a CYP3A4. A utilização concomitante de fármacos, ou desses, com determinados tipos de alimentos ou fitoterápicos que apresentem agonismo ou antagonismo com receptores nucleares, pode interferir na terapêutica. No Brasil, desde 2006, a prática da Fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) tem sido incentivada com a inserção de fitoterápicos na Relação de Medicamentos Essenciais e com a publicação de diversas normas sanitárias, regulando o setor. Uma dessas normas, publicada em 2010, refere-se a drogas vegetais e em seu anexo há uma lista de 66 espécies vegetais com a respectiva indicação terapêutica e posologia. A presente dissertação teve por objetivo avaliar os efeitos agonistas no receptor de pregnanos X (PXR) de nove espécies contidas na RDC 10/10 da Anvisa. Das espécies vegetais foram obtidos extratos os quais foram avaliados quanto a suas toxicidades pelo método do MTT e em seguida submetidos a ensaios de gene repórter a fim de avaliar seus efeitos na maquinaria transcricional do PXR. Os resultados do ensaio de gene repórter com o extrato de *Achyrocline satureioides* (macela) sugerem uma ação agonista dose-dependente no PXR, o que não aconteceu com as outras drogas vegetais estudadas. Não houve efeito agonista do extrato de *A. satureioides* nos receptores TR β e PPAR γ . Este trabalho constitui-se como base prospectiva para o aprofundamento do estudo da própria *A. satureioides*, no possível isolamento e identificação de seus compostos ativos, seus efeitos sobre enzimas que metabolizam xenobióticos, especialmente CYP3A4, bem como, para estudos de outras drogas vegetais constantes na RDC 10/10, visando assegurar o uso seguro e eficaz dessas espécies pela população.

Palavras-chave: drogas vegetais; receptor nuclear; PXR; RDC 10/10.

ABSTRACT

Nuclear receptors such as PPAR, GR, TR, ER and PXR, are related to diverse biological processes. Several natural and synthetic ligands have the ability to activate or repress them directly influencing their transcriptional machinery. The pregnanes X receptor (PXR), in particular, plays critical role in homeostasis, metabolism and excretion of xenobiotics and endobiotics through the regulation of P450 enzymes, especially CYP3A4. The concomitant use of drugs, or those, with certain types of food or herbal remedies that have agonism or antagonism with nuclear receptors, may interfere with therapy. In Brazil, since 2006, the practice of Herbal Medicine in Unified Health System (SUS) has been encouraged with the inclusion of herbal medicines in the List of Essential Medicines and the publication of several health conditions, regulating the industry. One of these standards, published in 2010, refers to herbal drugs and its attachment 66 is a list of plant species with the therapeutic indication and its dosage. The aim of this study was to evaluate the effects of receptor agonists in PXR from nine species contained in the RDC 10/10 of The *National Health Surveillance Agency* (Anvisa). From the plant species were obtained extracts which were evaluated for their toxicity by the MTT method and then tested for reporter gene to assess its effects on the transcriptional machinery of the PXR. The results of the reporter gene assay with the extract of *Achyrocline satureioides* (macela) suggest a dose-dependent agonist in PXR, which did not happen with other herbal drugs studied. There was no agonist effect of the extract of *A. satureioides* TR β receptors and PPAR gamma. This work constitutes itself as a prospective basis for further studies on *A. satureioides*, possible isolation and identification of its active compounds, their effects on xenobiotic metabolizing enzymes, particularly CYP3A4, as well as, for studies of other drug plants listed in the RDC 10/10, to ensure the safe and effective use of these species by the population.

Keywords: herbal drugs; nuclear receptor; PXR; RDC10/10.

“ A coisa principal da vida não é o conhecimento, mas o uso que dele se faz”

Do Talmude. Seleção de Theodore M.R. Von Keller

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura primária contendo os domínios funcionais dos receptores nucleares..... 17
- Figura 2** - Mudança estrutural das hélices 11, 12 e 2 do receptor nuclear estimulada pela interação ao ligante 18
- Figura 3** - Resumo da via de sinalização (ativação da maquinaria transcricional) do receptor de pregnanos X PXR pelos ligantes rifampicina e PCN (pregnenolona 16 α -carbonitrila)..... 21
- Figura 4** - Grupo prostético da enzima CYP 22
- Figura 5** - Ciclo representativo da ação das enzimas do citocromo P450 da fase I do metabolismo de xenobióticos 25
- Figura 6** - Esquema representativo de interação medicamentosa via enzimas do sistema P450 26
- Figura 7** - Avaliação da citotoxicidade dos extratos aquosos de *Cymbopogon citratus* (Capim limão); *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada); *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu de couro) e *Maytenus ilicifolia* (Espinheira santa) 47
- Figura 8** - Avaliação da citotoxicidade dos estratos aquosos de *Mikania glomerata*(Guaco); *Citrus aurantium* (Laranja amarga); *Achyrocline satureioides* (Macela); *Bidens pilosa* (Picão Preto) e *Malva sylvestris*..... 58
- Figura 9** - Curvas dose-respostas dos controles positivos sintéticos rifampicina e clotrimazol e natural *Hypericum perforatum* em PXR..... 51
- Figura 10** - Não há atividade transcricional por GAL4-DBD na presença dos extratos *E. macrophyllus*; *B. pilosa* e *A. satureioides*..... 52
- Figura 11** - Não há atividade transcricional por GAL4-DBD na presença dos extratos *M. glomerata*; *R. purshiana*; *M. ilicifolia* e ligantes..... 53

Figura 12 - Não há atividade transcricional por GAL4-DBD na presença dos extratos <i>C. citratus</i> ; <i>C. aurantium</i> ; <i>M. sylvestris</i> e ligantes.....	54
Figura 13 - Atividade transcricional do PMhPXRLBD GAL4 na presença dos ligantes sintéticos.....	55
Figura 14 - Atividade transcricional do PMhPXRLBD GAL4 na presença dos ligantes sintéticos.....	56
Figura 15 - Atividade transcricional do PMhPXRLBD GAL4 na presença dos ligantes sintéticos e extrato de <i>A. saturoioides</i>	57
Figura 16 - Efeito dose-dependente de <i>A. saturoioides</i> na ativação transcricional de PXR.....	59
Figura 17 - Não há atividade transcricional por PPAR γ na presença de <i>A. saturoioides</i>	60
Figura 18 - Não há atividade agonista da espécie <i>A. saturoioides</i> em TR β 1 <i>wild type</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Tipos de elementos responsivos e suas respectivas regiões promotoras nos genes das CYPs.....	21
Tabela 2	- Enzimas da CYP 450 e seus respectivos substratos	23
Tabela 3	- Resumo de drogas vegetais envolvidas na atividade transcricional de receptores nucleares.....	37
Tabela 4	- Resumo de drogas vegetais utilizadas nos ensaios biológicos...	41
Tabela 5	- Rendimento dos extratos vegetais	46
Tabela 6	- Resumo das viabilidades celulares dos extratos vegetais por meio do ensaio do MTT	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF-1	Função de ativação 1
AF-2	Função de ativação 2
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Receptor de androgênios
BPFC	Boas Práticas de Fabricação e Controle
CLAE	Cromatografia a liquido de alta eficiência
CYP	Citocromo P450
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR3	Repetição direta espaçada de 3 nucleotídeos
DR4	Repetição direta espaçada de 4 nucleotídeos
EMSA	Ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (gel shift)
ER	Receptor de estrogênio
ERR	Receptores relacionados ao estrogênio
ER α	Receptor alpha de estrogênio
ER β	Receptor beta de estrogênio
GAL4	Fator de transcrição de leveduras
GR	Receptor de glicocorticoide
GR α	Receptor alpha de glicocorticoide
GR β	Receptor beta de glicocorticoide
GRE	Elemento responsivo ao GR
HDACs	Desacetilases de histonas
HDL	Lipoproteína de densidade alta
LB	Meio Luria Bertani
LDB	Domínio de ligação ao ligante
Luc	Luciferase
MR	Receptor de mineralocorticoide
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCoR	Correpressor de receptores nucleares
PAR	Receptor ativado por pregnanos
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PPAR	Receptor ativado por proliferador peroxissomal
PPAR α	Receptor alpha ativado por proliferador peroxissomal
PPAR β	Receptor beta/delta ativado por proliferador peroxissomal
PPAR γ	Receptor gama ativado por proliferador peroxissomal
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR
PXR	Receptor de pregnanos X
PR	Receptor de progesterona
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia
RXR	Receptor do ácido retinoico X
SF-1	Fator esteroideogênico 1
SMRT	Mediador do silenciamento de receptor retinoico X
SRC-1	Coativador 1 de receptor esteroidal
SRC-2	Coativador 2 de receptor esteroidal
SRC-3	Coativador 3 de receptor esteroidal
SXR	Receptor esteroide e xenobiótico
SUS	Sistema único de saúde
TR	Receptor do hormônio tireoideano
VDR	Receptor da vitamina D
UV/VIS	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	RECEPTORES NUCLEARES	16
1.2	RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR)	20
1.3	CITOCROMO P450	22
1.4	METABOLIZAÇÃO DE XENOBIÓTICOS	23
1.5	PLANTAS MEDICINAIS COM EFEITOS AGONISTA/ANTAGONISTA EM RECEPTORES NUCLEARES	25
1.6	ESPÉCIES CONSTANTES NA RDC 10/10 E AÇÕES EM RECEPTORES NUCLEARES	32
2	OBJETIVOS	40
2.1	OBJETIVO GERAL	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	OBTENÇÃO DO DERIVADO VEGETAL	41
3.2	CULTURA DE CÉLULAS HELA	41
3.3	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS EM CÉLULAS HELA	42
3.4	ENSAIO DE TRANSATIVAÇÃO (TRANSFEÇÃO TRANSITÓRIA POR ELETROPORAÇÃO E ENSAIO DE GENE REPÓRTER) EM CÉLULAS HELA	42
3.4.1	Plasmídeos	43
3.4.2	Transformação e purificação dos plasmídeos	43
3.4.3	Ensaio de gene repórter por meio da transfecção transiente	44
3.4.4	Cálculo da taxa de ativação da transcrição	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

4.1	RENDIMENTO DOS DERIVADOS VEGETAIS.....	46
4.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS VEGETAIS POR MEIO DO ENSAIO DE MTT.....	46
4.3	ESTUDO DO EFEITO AGONISTA DOS DERIVADOS VEGETAIS NO RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR) POR MEIO DO ENSAIO DE GENE REPÓRTER - SISTEMA GAL4/GAL4RE.....	50
4.3.1	Controles positivos sintéticos (rifampicina e clotrimazol) e natural (<i>Hypericum perforatum</i>) - agonistas de PXR.....	50
4.3.2	Estudo do efeito de extratos aquosos de <i>Echinodorus macrophyllus</i>, <i>Bidens pilosa</i>, <i>Achyrocline satureioides</i>, <i>Mikania glomerata</i>, <i>Rhamnus purshiana</i>, <i>Maytenus ilicifolia</i>, <i>Citrus aurantium</i>, <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Malva sylvestris</i> em vetores de expressão pM.....	51
4.3.3	Estudo do efeito agonista de extratos aquosos de <i>Echinodorus macrophyllus</i>, <i>Bidens pilosa</i>, <i>Achyrocline satureioides</i>, <i>Mikania glomerata</i>, <i>Rhamnus purshiana</i>, <i>Maytenus ilicifolia</i>, <i>Citrus aurantium</i>, <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Malva sylvestris</i> na ativação transcricional de PXR.....	54
4.3.4	Efeito dose-dependente da <i>A. satureioides</i> na ativação de PXR.....	58
4.3.5	Ação do extrato vegetal de <i>A. satureioides</i> em receptores nucleares PPARγ e TRβ por meio do ensaio de gene repórter.	60
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 RECEPTORES NUCLEARES

Os receptores nucleares são proteínas que atuam como fatores de transcrição e ligam-se às moléculas sinalizadoras lipofílicas, dentre elas, hormônios esteroides e tireoideanos, ácidos retinoicos e ácidos graxos, regulando a atividade de genes-alvo envolvidos em processos de desenvolvimento, reprodução, metabolismo de carboidratos e lipídios de mamíferos (1, 2).

Sendo assim, a principal função desses fatores de transcrição é regular positiva ou negativamente a expressão gênica na transcrição (3).

Sabe-se que 48 genes codificam a superfamília de aproximadamente 50 receptores nucleares. Esses receptores possuem, em suas estruturas, regiões bem definidas que incluem o domínio amino-terminal (domínio A/B), contendo a função da ativação AF-1; o domínio de ligação ao DNA (DBD) no qual ocorre a ligação aos elementos responsivos; o sítio de dobramento “hinge” responsável pela mudança conformacional do receptor; e o domínio de ligação ao ligante (LBD), contendo a função de ativação AF-2, que é responsável pelo reconhecimento de ligantes e recrutamento de cofatores que irão ativar a maquinaria transcricional do receptor nuclear (**Figura 1**) (4-7).

O LBD tem pelo menos quatro funções, são elas: dimerização, ligação ao composto com função de ligante, ligação a coativadores ou correpressores e a transativação. Nesta região, normalmente estão presentes 11 hélices que formam uma estrutura compacta compreendendo a cavidade de ligação ao ligante. Na entrada da cavidade está presente a hélice 12 contendo resíduos determinantes para função de ativação AF-2. A transativação pode ser vista como a mudança do estado de inativação para o estado de ativação de um receptor nuclear (7, 8).

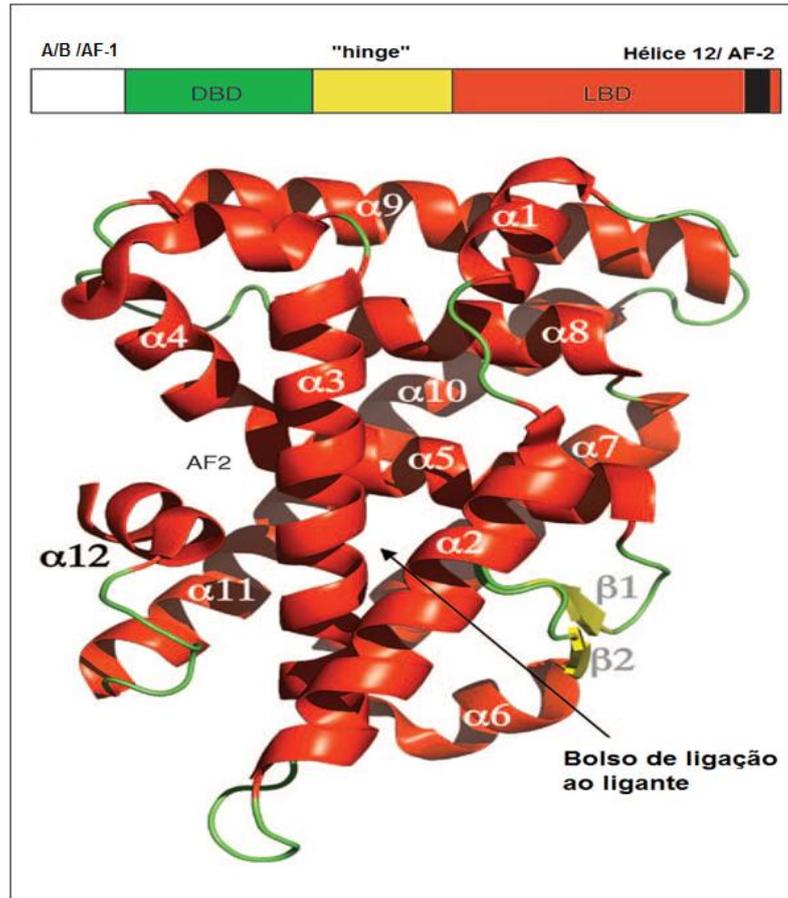


Figura 1 - Estrutura primária contendo os domínios funcionais dos receptores nucleares. Domínio amino-terminal (domínio A/B), contendo a função de ativação (AF-1); o domínio de ligação ao DNA (DBD), sítio de dobramento "hinge" e o domínio de ligação ao ligante (LBD), contendo a função de ativação (AF-2), e uma visão geral de sua estrutura terciária. Adaptado de (9).

Enquanto a região de domínio que contém o AF-1 é capaz de ativar a transcrição independente de hormônios, a região AF-2 muda a conformação do LBD e só é ativada em resposta a hormônios. Quando ocorre a ativação dos receptores, a mudança estrutural permite que a região AF-2 se reposicione e permita o acesso de vários coativadores estimulados por contatos hidrofóbicos (**Figura 2**) (10-12). Na maioria dos receptores nucleares a cavidade de ligação ao ligante é composta por resíduos hidrofóbicos e resíduos polares que orientam a ligação ao ligante (13).

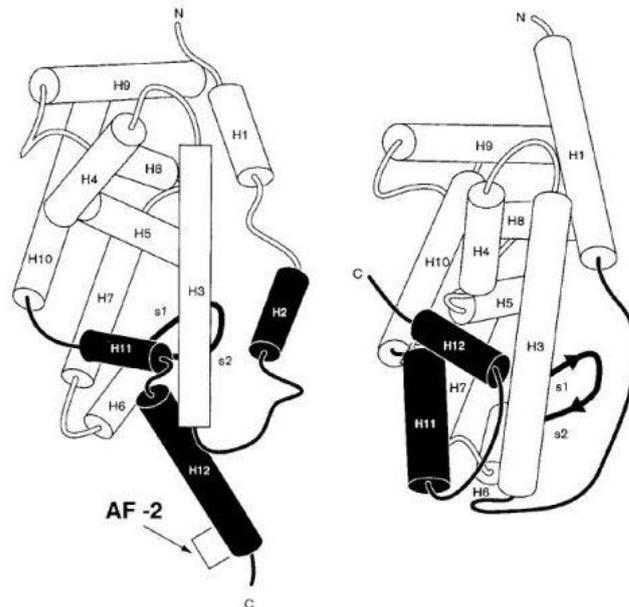


Figura 2 - Mudança estrutural das hélices 11, 12 e 2 do receptor nuclear estimulada pela interação ao ligante. Adaptado de (14).

Os receptores nucleares modulam a transcrição pelo recrutamento de cofatores e componentes da maquinaria transcricional basal. Cofatores são proteínas capazes de ativar ou reprimir o processo de transcrição dos receptores nucleares. O SRC-1 - coativador 1 do receptor de esteroides -, por exemplo, comporta-se como ativador. Na ausência do ligante, os receptores nucleares com exceção dos receptores de glicocorticoide, recrutam complexos repressores como HDACs, SMRT e NCoR restringindo a transcrição (15).

Helsen *et al.* (2012) classificam os receptores nucleares de acordo com a sua característica de ligação ao DNA, reconhecido por elemento responsivo, em três grupos: o primeiro, constituído por receptores esteroides homodímeros de glicocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR), estrogênio (ER), progesterona (PR) e androgênio (AR); o segundo grupo, composto de receptores que se dimerizam com o receptor derivado do ácido retinoico - ácido 9-cis retinoico (RXR), dentre eles, os receptores: de hormônio tireoideano (TR), de vitamina D (VDR), ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs); e de pregnanos X (PXR). O terceiro grupo é representado por receptores que se ligam ao DNA como monômeros e podem ser modulados em condições não fisiológicas por estrogênios sintéticos (ERR) ou por fosfolípídeos, como o fator esteroidogênico (SF-1) (16).

Dentre os receptores nucleares, os de glicocorticoide (GR) constituem-se como principais moduladores de respostas aos processos inflamatórios e imunológicos. Esses receptores, que estão ligados aos seus elementos responsivos (GRE), promovem o recrutamento de coativadores SRC-1, SRC-2, SRC-3 e do tipo fator nuclear κ b (17-19).

Existem duas isoformas do GR (GR α e GR β) diferentes entre si na quantidade de aminoácidos em suas regiões amino-terminal e são expressas respectivamente em músculo esquelético e células inflamatórias do sangue (20). GR β atua como regulador negativo dominante da atividade transcricional do GR α , único que interage com hormônios glicocorticoides, pela sua heterodimerização com este receptor, e está relacionado a doenças de resistência ao glicocorticoide incluindo asma, artrite reumatoide, dentre outras (21, 22).

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) atuam na homeostase da glicose, metabolismo de lipídios e inflamação (23). Existem três diferentes isoformas de PPARs: α , β e γ (24). Esse receptor forma o heterodímero PPAR/RXR e liga-se ao elemento responsivo específico (PPRE/DR-1). Após recrutar fatores como coativadores-1, inicia sua transcrição (25).

O PPAR α está preferencialmente expresso em tecidos com alta capacidade oxidativa como fígado, rins e coração e atua na modulação de respostas que reduzem os triglicérides, colesterol total e, ainda, aumentam os níveis de HDL (26-29). PPAR β possui vasta expressão, porém nenhum gene alvo específico foi encontrado, e sua função ainda é pouco conhecida (30). O PPAR γ é altamente expresso em tecido adiposo branco e marrom. No tecido branco atua na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (31).

Por meio de receptores ER, os hormônios estrogênicos exercem função crucial no sistema reprodutor e estão diretamente relacionados à ocorrência de neoplasmas de mama e de endométrio e à osteoporose (32). Existem dois subtipos de receptores de estrogênio, o ER α e o ER β que são codificados pelos genes localizados nos cromossomos 6 e 14. O ER α é expresso no útero e no tecido vascular e o ER β nos rins, glândula pituitária, cólon e útero (33-35).

Atuando por meio de receptores TR dimerizados ao RXR e ligados aos elementos responsivos (DR4), os dois principais hormônios tireoidianos, 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T₄) e o 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T₃) são utilizados, por exemplo, na reposição hormonal em pacientes com hipotireoidismo (36, 37). Esses receptores

expressam-se sob duas isoformas: o TR β que está presente no cérebro, glândula pituitária anterior e retina, e o TR α que se encontra em quase todos os tecidos, especialmente no tecido cardíaco, cérebro e músculos esqueléticos (38-41).

1.2 RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR)

Originalmente identificado em 1998, o receptor de pregnanos X (PXR), codificado pelo gene NR1I2 e também conhecido por receptor esteroide e xenobiótico (SXR) e ainda por receptor ativado por pregnanos (PAR) é um dos componentes da superfamília de receptores nucleares (42). Assim foi denominado pela observação de que altas concentrações de pregnanos poderiam atuar como seus ligantes naturais (43).

Este fator de transcrição além de exercer função crucial na homeostase de metabolização e eliminação de endobióticos e xenobióticos por meio da regulação de enzimas do citocromo P450 - especialmente a CYP3A4 e proteínas transportadoras como as proteínas resistentes a múltiplos fármacos (Multidrug resistance protein- MDR1) e a (Multidrug-resistance-associated protein - MRP2) (44, 45)-, também está intimamente envolvido na homeostase energética e nos processos inflamatórios (46, 47).

Os genes do PXR humano mapeados no cromossomo 13q11-13, compreendem 9 exons com 38Kb de tamanho e aproximadamente 50 a 60 resíduos em sua cavidade de ligação ao ligante (48, 49). Dentre suas 15 isoformas, pelo menos duas: PXR1 e PXR2 apresentam expressão significativa principalmente no fígado e intestino (50-52).

Assim como os outros receptores nucleares, o PXR tem o domínio de ligação ao DNA (DBD) ligado por meio da região “hinge” ao domínio de ligação ao ligante (LBD) o qual contém a região de função de ativação (AF-2) (53).

Para exercer suas funções, o PXR, após ligar-se ao ligante, dimeriza-se ao ácido 9-cis retinoico (RXR) e liga-se a sítios específicos de ligação ao DNA, chamados de elementos responsivos (ER6, DR3 e DR4) (**Tabela 1**) presentes na região promotora dos genes da CYP (**Figura 3**) (54, 55).

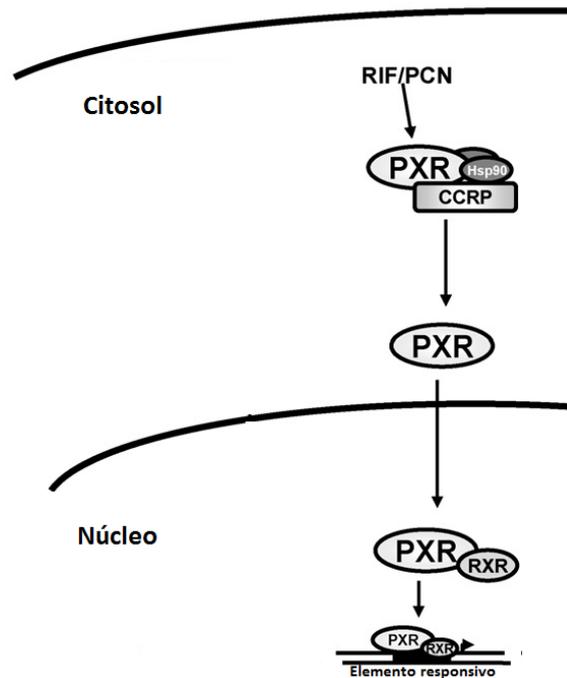


Figura 3 - Resumo da via de sinalização (ativação da maquinaria transcricional) do receptor de pregnanos X PXR pelos ligantes rifampicina e PCN (pregnenolona 16 α -carbonitrila). Adaptado de (56).

Tabela 1 - Tipos de elementos responsivos e suas respectivas regiões promotoras nos genes das CYPs. Adaptado de (54).

Gene	Sequência (elemento responsivo)	Tipo
CYP2B6	TTGGTTCAGGAAAGTCCA	DR4
CYP2C9	AGAGGTCAGAAGAGTTTG	DR4
CYP2C19	GGGGTTCAGAAGAGTTTG	DR4
CYP3A4	GAGGGTCAGCAAGTTCA	DR3
CYP3A4	TGAACTCAAAGGAGGTCA	ER6

Durante este processo de ativação do receptor, o PXR é capaz de recrutar coativadores entre eles os membros da família P160 como o SRC-1 (receptor coativador esteroide -1) para se ligar na região AF-2 (57).

A atividade transcricional do PXR pode ser modulada por diversos ligantes como fármacos, poluentes ambientais e ainda fitoterápicos (47). A grande flexibilidade e amplitude da cavidade de ligação, volume de aproximadamente 1350

Á³, são responsáveis por aceitar moléculas de variadas dimensões e ainda pequenas moléculas com múltiplas orientações (58).

Os ligantes podem ter pesos moleculares que variam de 300 Da como clotrimazol até mais de 800 Da como a rifampicina. Sendo assim, fatores como o peso molecular, a forma dos ligantes, e a quantidade de interações, hidrofóbicas, principalmente a interação aromática, e as ligações de hidrogênios parecem ser determinantes para a ligação ao receptor nuclear PXR (59).

1.3 CITOCROMO P450

Os citocromos P450 constituem uma superfamília de enzimas encontradas desde bactérias a humanos que catalisam uma grande variedade de reações químicas como hidroxilação, oxidação e redução (60). Em humanos, já foram relatados 115 genes da CYP, porém apenas 57 são funcionais (61).

As enzimas do sistema P450 são hemoproteínas contendo monooxigenases no qual o heme, ligado à apoproteína por uma cisteína, apresenta-se como um grupo prostético constituído de um íon de ferro e 4 átomos de nitrogênio da porfirina (**Figura 4**) (62). São proteínas com aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos (63).

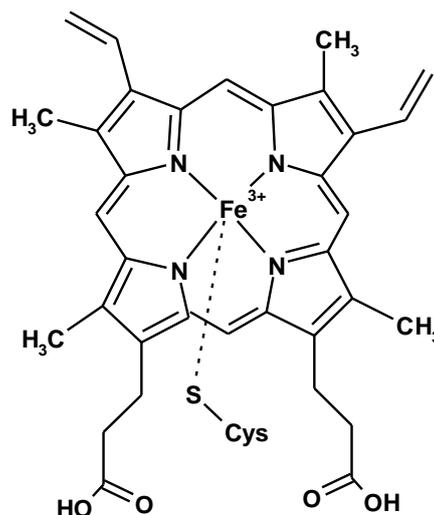


Figura 4 - Grupo prostético da enzima CYP.

As enzimas desse sistema são agrupadas em famílias e subfamílias com base no percentual de similaridade de suas sequências de aminoácidos. Enzimas

que apresentam mais de 40% de similaridade são agrupadas na mesma família, que é indicada por um algarismo arábico. Aquelas que possuem mais de 55% de similaridade em suas sequências são agrupadas na mesma subfamília, representada por uma letra após o número arábico indicativo da família (64). Assim, o símbolo CYP é seguido por um número de acordo com família, uma letra de acordo com a subfamília e por último, um número de acordo com o gene (65).

Essas enzimas estão presentes em todo o corpo humano, porém em maior quantidade no fígado, retículo endoplasmático assim como nos tecidos extra-hepáticos e sua expressão está intimamente relacionada a polimorfismo genético assim como também à exposição de fármacos utilizados na terapêutica e ainda consumo de álcool (66-68).

As CYPs apresentam basicamente duas importantes funções: biossíntese de compostos endógenos e metabolização de xenobióticos. Dentre os substratos endógenos estão os ácidos graxos saturados e insaturados, os eicosanoides e os ácidos biliares. Em relação aos substratos exógenos, encontram-se os fármacos, poluentes ambientais e químicos e produtos de plantas (64). Algumas das mais importantes enzimas desse sistema são CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9 (**Tabela 2**) (69).

Tabela 2 - Enzimas da CYP 450 e seus respectivos substratos. Adaptado de (70).

Enzima	Substratos (fármacos)
CYP1A2	Clozapina e acetaminofeno
CYP2D6	Haloperidol, risperidona e codeína
CYP2C9	Diclofenaco, carbamazepina e piroxicam
CYP2C19	Varfarina e propranolol
CYP3A4	Etinilestradiol, ritonavir, e rifampicina

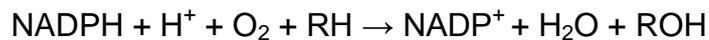
1.4 METABOLIZAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

Compreendem a classe dos xenobióticos compostos geralmente lipofílicos aos quais o organismo humano está exposto, como os poluentes ambientais, aditivos químicos, produtos cosméticos e fármacos (71).

A metabolização desses compostos pode ser dividida em duas etapas. Na primeira etapa (ou fase I), ocorrem reações para aumentar a polaridade de compostos lipofílicos, dentre elas: oxidação, redução e hidrólise. Nesta etapa, um grupo funcional polar é introduzido na molécula pelas enzimas monooxigenases do sistema do citocromo P450, das flavinas monooxigenases e das epóxi hidrolases (72-74)

Na segunda etapa (ou fase II), com o objetivo de inativar os produtos resultantes da primeira etapa, ocorrem reações de conjugação como glicuronidação, sulfonação, dentre outras. As enzimas participantes dessa fase são as glutathione-S-transferase, UDP glicuronosil transferases e sulfotransferase. Ambas as etapas atuam em conjunto com o objetivo de aumentar a eliminação renal do xenobiótico (72, 75, 76).

A reação geral catalisada pelo citocromo P450 pode ser representada conforme a reação:



RH representa um substrato oxidável (xenobiótico), e ROH é o metabólito hidroxilado, onde a reação final é sempre catalisada por uma enzima P450 (77).

O ciclo catalítico das enzimas do sistema P450 (**Figura 5**) inicia-se com a ligação do substrato (RH) ao ferro do grupamento heme da enzima e logo após o recebimento de um elétron. O íon férrico (Fe^{3+}) é, então, reduzido a íon ferroso (Fe^{2+}) permitindo a fixação do oxigênio. O recebimento de um segundo elétron faz com que o oxigênio seja ativado e permita a entrada de outro átomo de oxigênio. Totalizando dois átomos de oxigênio, o primeiro liga-se ao substrato enquanto que o segundo associa-se com prótons e dois elétrons para a formação da água. Os elétrons são doados pela coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato em seu estado reduzido (NADPH) (78).

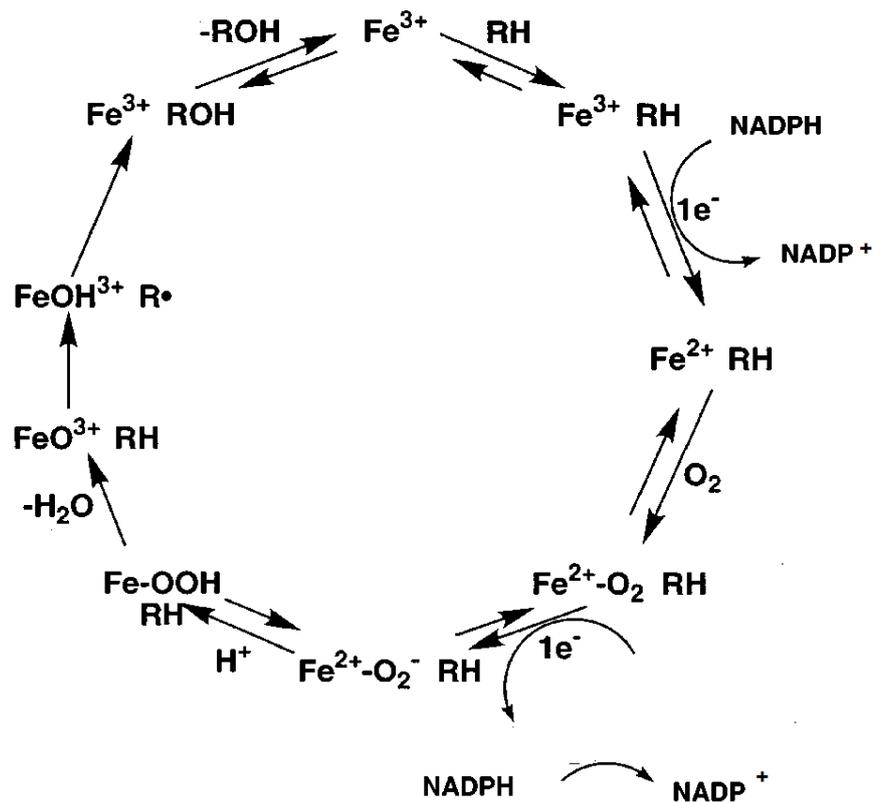


Figura 5 - Ciclo representativo da ação das enzimas do citocromo P450 da fase I do metabolismo de xenobióticos. Adaptado de (78).

Geralmente a indução das enzimas da CYP 450 é tecido-específico, reversível e resulta em ineficiência do fármaco, pois aumenta sua biotransformação e diminui sua concentração plasmática. De forma contrária, a sua inibição resulta em aumento das concentrações plasmáticas e teciduais implicando em efeitos tóxicos, constituindo-se como a mais prejudicial das interações medicamentosas. Desta forma, conclui-se que as interações medicamentosas surgem em consequência de como os fármacos são metabolizados no organismo (**Figura 6**) (79-82).

A CYP3A4 é a principal enzima desse sistema, correspondendo a 40% do total de enzimas CYPs no fígado humano é responsável por converter xenobióticos em metabólitos mais solúveis para serem excretados e é regulada por receptores PXR também expressos em grande quantidade no fígado e em menor proporção em outros tecidos como intestino, cólon e rins (78, 83, 84). Esta enzima está envolvida no metabolismo de aproximadamente 50% de todos os medicamentos prescritos e sua indução potencializa o surgimento de possíveis interações entre fármacos no qual um fármaco pode acelerar metabolismo do segundo fármaco (85, 86).

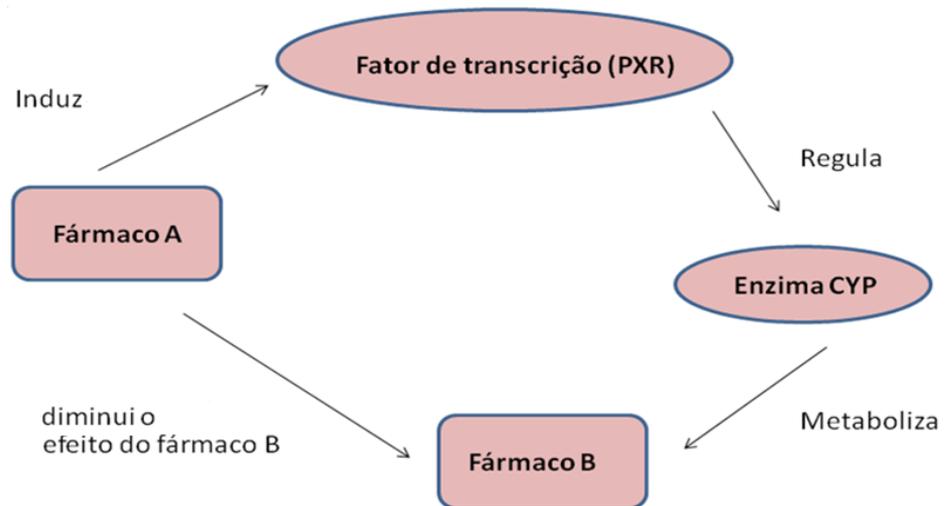


Figura 6 - Esquema representativo de interação medicamentosa via enzimas do sistema P450. Adaptado de (87).

Muitos dos compostos que ativam o PXR também foram reportados como indutores da atividade das enzimas do sistema de enzimas do citocromo P450, especialmente a CYP3A. Rifampicina, clotrimazol e o plaxitaxel são exemplos desses indutores. Este fato propõe que estes ligantes teriam propriedades biológicas em comum mesmo não sendo quimicamente relacionados. Adicionado à informação que o heterodímero PXR-RXR poderia ligar-se a região promotora do CYP3A, concluiu-se que o PXR seria, então, um dos principais reguladores dessa enzima (88). Além do PXR, outros receptores nucleares como o da glicocorticoide já foi reportado por sua ação indutora da expressão das CYPs (86).

1.5 PLANTAS MEDICINAIS COM EFEITOS AGONISTA/ANTAGONISTA EM RECEPTORES NUCLEARES

O uso de recursos naturais aliado ao conhecimento tradicional na utilização de plantas medicinais é uma prática milenar. Muitos produtos vegetais e suas formas de uso constituem-se como importantes fontes terapêuticas principalmente de países em desenvolvimento. Vários fatores contribuem para este cenário, dentre eles, o alto custo de medicamentos industrializados, a facilidade de obtenção de

plantas medicinais a baixos custos e ainda a crença de que o “natural” é inofensivo (89, 90).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Medicina Tradicional, incluindo o uso de plantas medicinais, apresenta-se como a principal opção terapêutica de aproximadamente 65% da população mundial (91). O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano e no Brasil calcula-se que o comércio de fitoterápicos seja da ordem de 5% do mercado total de medicamentos, avaliado em mais de US\$ 400 milhões (92, 93).

O Brasil é fonte de muitas espécies vegetais que desempenham importante papel na medicina popular. Plantas medicinais são comercializadas em ervanárias, feiras livres e mercados públicos, que não estão sujeitos a um controle eficiente por parte da vigilância sanitária. Drogas vegetais e medicamentos fitoterápicos, por outro lado, só são comercializados em farmácias e drogarias (94).

Devido à importância das plantas medicinais e fitoterápicos na medicina popular brasileira e com o objetivo de garantir o acesso da população a fitoterápicos caracterizados por sua eficácia, segurança e qualidade, foram adotadas políticas públicas que resultaram em publicações como a Portaria 971, em 03 de maio de 2006, que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), abrangendo a fitoterapia, homeopatia, acupuntura e termalismo-social (95).

Neste mesmo ano, o Decreto 5.813 de 23 de junho de 2006 aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) reconhecendo as práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros e incentivando a produção nacional voltada para a biodiversidade do país (96).

Em apoio à PNPMF, diversas normas foram publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), dentre as quais a norma para a notificação de drogas vegetais, denominada RDC 10/10, regulamentando a produção e o uso das drogas vegetais (97).

Em 20 de abril de 2010, foi publicada pelo Ministério da Saúde a Portaria 886 que instituiu a Farmácia Viva no âmbito do SUS. De acordo com esta portaria, estes estabelecimentos sujeitos à regulamentação sanitária e ambiental específicas, devem realizar o cultivo, a coleta, o armazenamento e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos para o SUS (98).

As iniciativas de inserção da Fitoterapia no SUS resultaram no estímulo à produção de medicamentos fitoterápicos, à criação de Farmácias Vivas e à prática da fitoterapia com base em evidências científicas. Contudo, poucos fitoterápicos disponíveis no SUS são derivados de plantas nativas do Brasil, pois a maioria das espécies brasileiras e seus derivados não foi analisada cientificamente quanto à eficácia e à segurança de sua utilização. *Baccharis trimera* (carqueja), por exemplo, apresentou toxicidade por via oral e intraperitoneal em modelos de estudos com animais, sinalizando que podem conter substâncias citotóxicas ou mutagênicas (99-101). A ocorrência de alterações neurotóxicas e nefrotóxicas, em humanos e animais, pela ingestão de *Averrhoa carambola* (carambola) e outras plantas contendo oxalatos é bem relatada na literatura (102-104).

Além da toxicidade inerente de algumas espécies vegetais, a eficácia e a segurança da terapia com plantas medicinais ou fitoterápicos podem estar comprometidas quando há o uso concomitante desses com fármacos sintéticos, pois essa associação pode gerar interações medicamentosas potencialmente fatais. Essas interações estão associadas à absorção e à biotransformação que são realizadas por enzimas do sistema do citocromo P450 (CYP) (78, 83, 84).

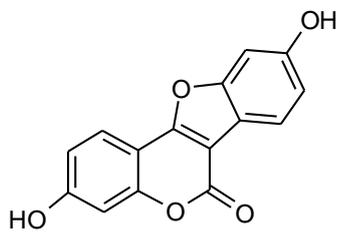
Até o final da década de 1990 poucas referências poderiam ser encontradas sobre as interações entre plantas medicinais e fármacos. Nos últimos 10 anos, no entanto, muitos relatos sobre as possíveis ocorrências de tais interações são encontrados na literatura científica, devido a casos de importância clínica. *Hypericum perforatum* (erva de São João) pode ser citada como exemplo, pois quando associada ao tratamento com o anticoagulante varfarina reduz o efeito desse fármaco que tem a sua velocidade de biotransformação aumentada. O uso desta espécie vegetal também já foi associado à redução dos níveis de ciclosporina em pacientes transplantados e, ainda, com contraceptivos orais (105-107).

Dessa forma, a identificação de metabólitos secundários - produtos do metabolismo vegetal -, tem sido de suma importância para o conhecimento dos efeitos terapêuticos das plantas medicinais.

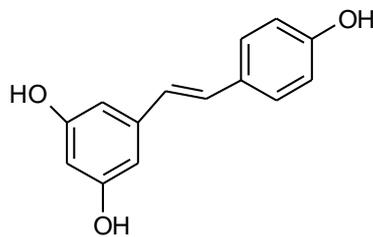
Receptores de estrogênio (ER): diversos compostos bioativos atuam via ER modulando a ação de estrogênios endógenos. Dentre esses compostos estão as cumarinas, por exemplo, o cumestrol **(1)** (108), os estilbenos como o resveratrol **(2)** (109) e os flavonoides como: isoflavonas [genisteína **(3)**] (110), flavonas [apigenina **(4)**], flavononas [naringenina **(5)**] (111) e flavonol [kampferol **(6)**] (108, 110-112). O

resveratrol (**2**) (triidroxi-3,5,4'-estilbeno) é encontrado em diversos alimentos tais como uva e amendoim e apresenta propriedades anticancerígenas e cardioprotetora; além disso, sua habilidade de interagir com os ERs e ativá-los está bem descrita na literatura (109, 113-115).

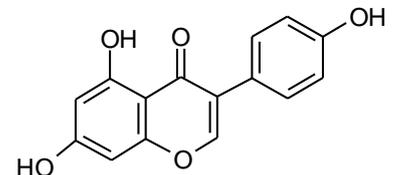
A naringenina (**5**) apresenta fraca ação estrogênica, porém seu derivado 8-prenilnaringenina (**7**) possui maior atividade (116). Isoflavonas isoladas de *Erythrina poeppigiana* - 3'-isoprenil-genisteína (**8**) e cristacarpina (**9**) -, tendem a apresentaram-se como ligantes de ER α e ER β (117).



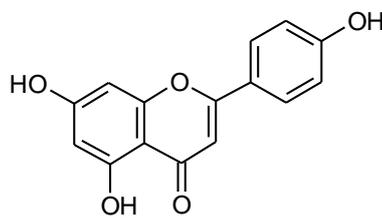
1



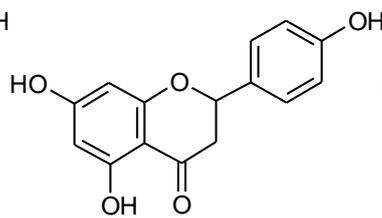
2



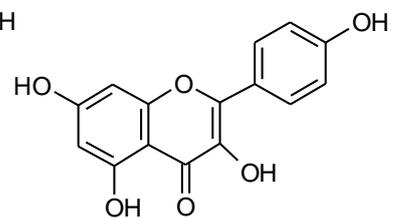
3



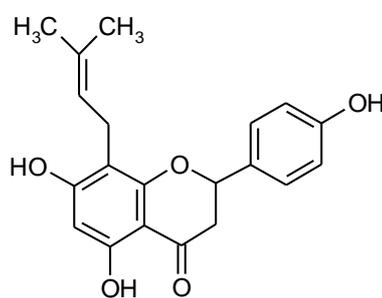
4



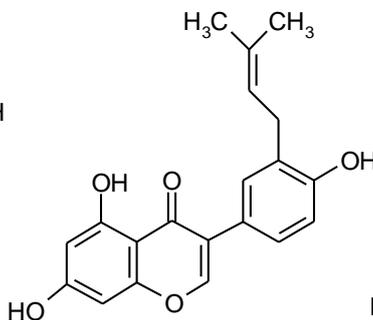
5



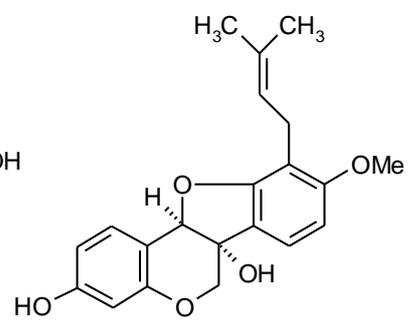
6



7



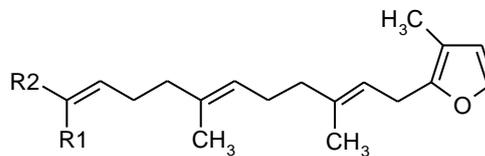
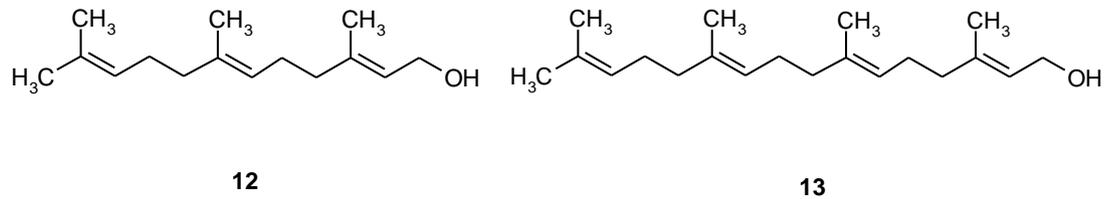
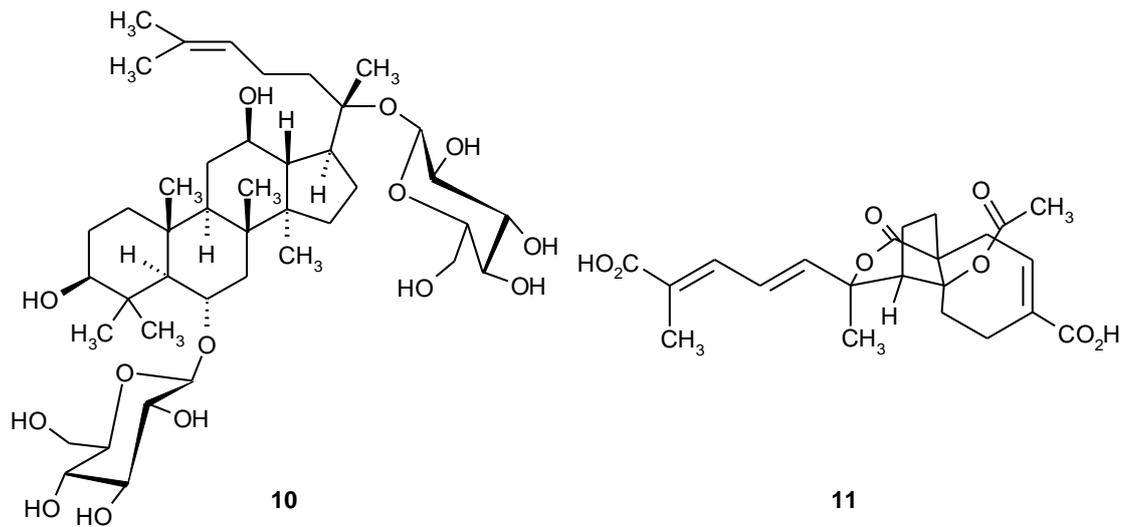
8



9

Receptores de glicocorticoide (GR): algumas espécies medicinais com atividade anti-inflamatória já foram descritas como ligantes do GR, por exemplo, *Commiphora mukul* que apresentou resultado positivo para antagonismo (118, 119). O ginsenosídeo (RG1) **(10)**, de *Panax ginseng* atua ligando-se ao GR (120). Este metabólito inibiu a translocação do fator nuclear kappa-beta e sua ligação ao DNA, apresentando-se também como um promissor agente neuroprotetor (121).

Receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs): em receptores PPAR, o extrato alcoólico de ácido pseudolárico B **(11)**, obtido da casca de *Pseudolarix kaempferi* apresentou alta taxa de atividade nas três isoformas α , β e γ (122). Os bioativos terpênicos, farnesol **(12)** e geranilgeraniol **(13)** também apresentaram efeitos em receptores PPAR γ (122-124). Saurufuranos A **(14)** e B **(15)**, diterpenos do tipo furano encontrados em *Saururus chinensis*, foram identificados como ativadores de PPAR(125). Flavonoides como apigenina **(4)** e kampferol **(6)**, também ativam o PPAR γ (126). Ginsenosídeos, isolados da espécie *Panax ginseng*, exerceram ação negativa na regulação de PPAR α inibindo, desta forma, sua atividade transcricional (123, 127).



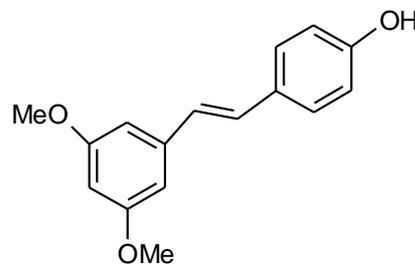
14 R1 = COOH, R2 = CH₃

15 R1 = CH₃, R2 = COOH

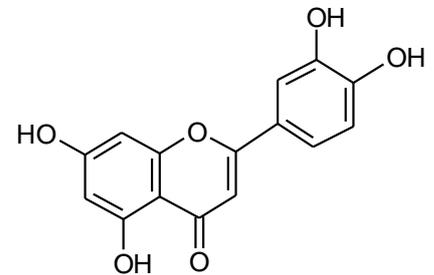
Em alguns casos, a estereoisomeria exerce papel importante na interação fármaco-receptor. Foi mostrado que dois grupos metoxila do isômero *trans* do pterostilbeno (**16**), análogo do resveratrol (**2**), estabeleceram ligações de hidrogênio com os resíduos Ser280 e Tyr464 do PPAR e ativaram a transcrição desse receptor, enquanto que o isômero *cis* não apresentou o mesmo efeito (128).

Receptor de pregnanos X (PXR): Várias espécies vegetais apresentam interação com receptores nucleares PXR e enzimas CYP, resultando em potencial interação medicamentosa. *Commiphora mukul* ativou o receptor PXR e ainda, induziu a CYP3A4 em hepatócitos humanos, sugerindo que o tratamento com essa planta medicinal deva ser cauteloso em pacientes que utilizam medicamentos

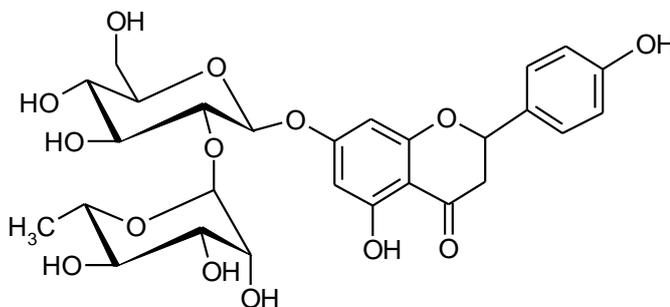
metabolizados pelos membros da família da CYP3A4 (129). Flavonoides como luteolina (**17**) e apigenina (**4**) também ativaram o PXR (130). Biflavonas e fenilpropanos identificados na *Hypericum perforatum* ativam o PXR (131) e a narigina (**18**) do *Citrus paradisi* - pomelo, inibe a CYP3A4 (132). A inibição dessa enzima pelos flavonoides parece estar ligada ao número de grupos hidroxila assim como também à posição destas. O potencial inibitório apresenta-se maior na quercetina (**19**), com cinco grupos hidroxila, e menor na apigenina (**4**) com apenas três (130-134).



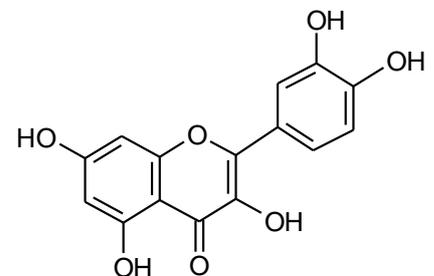
16



17



18



19

1.6 ESPÉCIES CONSTANTES NA RDC 10/10 E AÇÕES EM RECEPTORES NUCLEARES

Considerando as políticas PNPMF e PNPIC para inserção da fitoterapia no SUS, em 10 de março de 2010 foi publicada uma norma para a notificação de

drogas vegetais, denominada RDC 10/10, que regula a produção, distribuição e o uso de sessenta e seis drogas vegetais que foram padronizadas quanto aos aspectos: indicações terapêuticas, formas de uso e posologia. Seguindo as Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC), as drogas vegetais notificadas na Anvisa possuem qualidade e identidade comprovada e são validadas pelo uso tradicional. Podem ser utilizadas de forma oral ou tópica para o alívio sintomático das doenças e não são caracterizadas como medicamentos. São destinadas ao preparo de infusões, macerações e decocções (95-97, 135).

A **Tabela 3** mostra as espécies constantes na RDC 10/10 para as quais há evidências de atividades transcricionais em receptores nucleares. Das sessenta e seis espécies vegetais listadas na RDC 10/10, trinta são relatadas na literatura quanto à capacidade de ligação a receptores nucleares (PPAR, GR, ER, TR e PXR) atuando como agonistas ou antagonistas e ainda induzindo ou inibindo a expressão de enzimas do citocromo P450 (CYP3A4, 1A2, 2E1 e outras). Essas alterações na atividade, principalmente, da CYP3A4, podem potencializar possíveis interações medicamentosas (136).

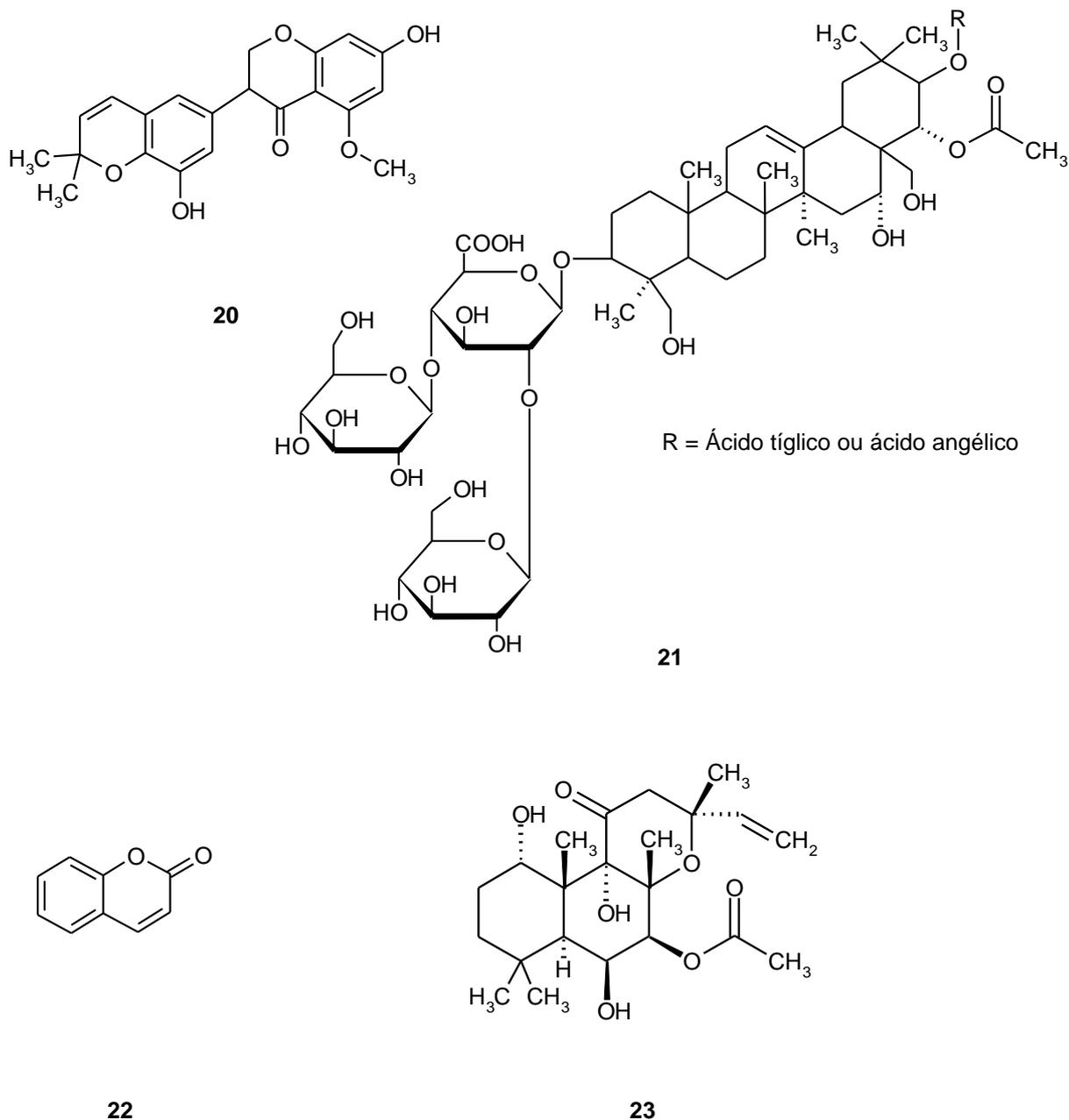
Dentre as espécies presentes na RDC 10/10 destacam-se *Allium sativum* que apresenta altas concentrações de flavonoides, principalmente quercetina (**19**) e apigenina (**4**) (137), *Citrus aurantium* que contém naringenina (**5**) (138), *Curcuma longa* contendo a quercetina (**19**) (137), *Lippia Alba* que contém a apigenina (**4**) (139) e *Glycyrrhiza glabra* que contém glicirrisoflavanona (**20**) (140). Esses compostos atuam como moduladores da atividade de receptores PPAR, estimulando sua transcrição. Essa interação parece estar ligada à quantidade e posições dos grupos hidroxila da apigenina (**4**), kampferol (**6**), naringina (**18**) e genisteína (**3**) nos carbonos 5', 7' e 4' e da quercetina (**19**) nos carbonos 5', 7', 3', 4' (124, 126, 141-143).

Nos estudos realizados com os receptores nucleares do glicocorticoide (GR), a espécie *Aesculus hippocastanum*, conhecida popularmente como castanha da Índia, possui escina (**21**) como composto bioativo que exerce efeito agonista nesse receptor (144). De acordo com a RDC 10/10, seu efeito se daria nos quadros patológicos de fragilidade venosa, porém outros estudos com esta espécie relatam a ação anti-inflamatória, fato justificado pelo aumento de expressão de GR, pois este receptor reprime a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores da

inflamação. Este resultado foi observado por meio do ensaio de Western Blotting (144, 145).

Apesar de não ter sido reportado pela RDC 10/10, o uso de *Justicia pectoralis* e da *Achillea millefolium* no tratamento de distúrbios menstruais, há relatos do efeito agonista em ER(146, 147). A atividade estrogênica pode estar associada à alta quantidade de cumarina **(22)** e apigenina **(4)** presentes na espécie *Justicia pectoralis*. Apigenina **(4)** também ocorre em *Achillea millefolium*, e é capaz de ativar tanto a isoforma α quanto a β de ER (146). *Momordica charantia*, também apresentou esta atividade, porém na RDC 10/10 é preconizado o uso tópico em dermatite e escabiose (146-148).

No que se refere aos estudos com receptores nucleares do tipo receptor de pregnanos X (PXR), duas espécies vegetais constantes na RDC 10/10 apresentaram atividade agonista quando submetidas a ensaio de gene-repórter: a *Harpagophytum procumbens*, conhecida popularmente com garra do diabo, indicada no tratamento de artrite, artrose e artralgia; *Plectranthus barbatus*, conhecido popularmente como boldo nacional apresenta o diterpeno forskolina **(23)** como princípio ativo. Esse composto possui estrutura análoga aos esteroides que são conhecidos agonistas desse receptor nuclear e assim como estes, ativa o PXR (42, 149-151). A espécie *Harpagophytum procumbens* apresentou da ativação do PXR(152).



Das espécies listadas na **Tabela 3**, dezenove inibem várias isoformas das CYP: 2C19, 2C9, 2B1, 1A2, 2D6, 3A4, 3A5, 3A6. Uma vez que os constituintes de plantas medicinais podem inibir competitivamente essas enzimas, a ingestão simultânea de derivados dessas plantas pode aumentar ou diminuir os níveis séricos de agentes terapêuticos utilizados, por exemplo, no tratamento de câncer e HIV. *Allium sativum* diminui a disponibilidade dos antirretrovirais saquinavir e ritonavir que são metabolizados pela CYP3A4 (153). Já foi descrito também que além de *Allium sativum*, *Matricaria chamomilla* e *Zingiber officinale* inibem a CYP2C9, a qual é responsável por oxidar a varfarina, conhecido anticoagulante e antiplaquetário

(154). *Uncaria tomentosa* inibe a CYP3A4 e seu uso pode gerar o aumento da concentração de inibidores de protease como o saquinavir e ritonavir. *Eucalyptus globulus* também é conhecido por inibir esta enzima. (154-158).

As plantas medicinais são dotadas de inúmeras moléculas complexas que agindo de forma sinérgica ou não, podem contribuir para mesma atividade biológica. A toxicidade, bem como a ação sinérgica (interação com outros fármacos), pode ocorrer comumente e por isso o estudo da relação estrutura/atividade e os mecanismos de ação constituem-se como peças chaves para que se possa compreender o efeito terapêutico produzido por estas drogas vegetais. Neste contexto, o estudo com receptores e enzimas representa um avanço nesta área (94, 159, 160).

Continuação

Tabela 3: Resumo de drogas vegetais envolvidas na atividade transcricionais de receptores nucleares.

Espécies	Receptor	Agonismo	Antagonismo	Enzimas	Método	Referências
<i>Achillea millefolium</i> L.	ER α,β	Sim		Inibe CYP3A4, 2C19	Ensaio de gene repórter Ensaio fluorométrico	(146) (82)
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	GR	Sim		Inibe CYP1A2, 2D6,3A4	Western Blot CLAE	(144) (161)
<i>Allium sativum</i> L.	PPAR γ		Sim	Inibe CYP2C9 e CYP2C19	EMSA Ensaio fluorométrico	(162) (163)
<i>Anacardium occidentale</i> L.				Inibe CYP3A4	Ensaio fluorométrico	(164)
<i>Arctium lappa</i> L.				Inibe CYP3A4, 2C19	Ensaio fluorométrico	(82)
<i>Cinnamomum verum</i> Presl.	PPAR α, γ	Sim			Ensaio de gene repórter	(165)
<i>Citrus aurantium</i> L.	PPAR α, γ PPAR α PPAR γ PPAR γ	Sim Sim Sim Sim			Ensaio de gene repórter Western blot Ensaio de gene repórter Ensaio de ligação	(138) (166) (167) (168)
<i>Curcuma longa</i> L.				Inibe CYP3A4 Inibe CYP2C9, 2C19, 2D6 Inibe CYP 1A2	CLAE CLAE CLAE Ensaio fluorométrico	(169) (170) (171)
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.				Inibe CYP2B1	Ensaio fluorométrico	(172)
<i>Equisetum arvense</i> L.				Inibe CYP 2C19	Ensaio fluorométrico	(82)
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.				Inibe CYP3A4	CLAE	(152)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	PPAR γ PPAR γ PPAR α ER α,β	Sim Sim Sim Sim			Ensaio de ligação Ensaio de gene repórter RT-PCR Ensaio de ligação	(173) (174) (175) (176)
<i>Harpagophytum procumbens</i> D.C.	PXR	Sim		Inibe CYP3A4 e 2D6 Inibe CYP3A4 Inibe CYP3A4, 2D6	Ensaio radiométrico Ensaio fluorométrico Ensaio fluorométrico	(177) (155) (178)
<i>Justicia pectoralis</i> Jacq.	ER α,β	Sim			Ensaio de gene repórter	(147)
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	PPAR α	Sim			RTC-PCR	(141)
<i>Matricaria recutita</i> L.				Inibe CYP3A4 Inibe CYP1A2, 2C9, 2D6	Ensaio fluorométrico Ensaio fluorométrico	(155) (179)
<i>Melissa officinalis</i> L.	PPAR α, γ	Sim			Western blot	(180)
<i>Mentha piperita</i> L.				Inibe CYP3A4	CLAE	(152)

Conclusão

Tabela 3: Resumo de drogas vegetais envolvidas na atividade transcricionais de receptores nucleares.

<i>Momordica charantia</i> L.	PPAR γ	Sim	Sim	Inibe CYP1A2, 2C9	RT-PCR	(181)
	ER α, β	Sim			Ensaio de gene repórter	(148)
	PPAR γ	Sim			Ensaio de gene repórter	(182)
<i>Peumus boldus</i> Molina	PPAR γ	Sim			Ensaio fluorométrico	(183)
<i>Plantago major</i> L.	ER β	Sim			Ensaio de gene repórter	(184)
<i>Plectranthus barbatus</i> Erews	PXR	Sim			Ensaio de ligação	(185)
<i>Punica granatum</i> L.	PPAR γ	Sim	Sim	Inibe CYP3A4 E 2D6	Ensaio de gene repórter	(149)
	PPAR γ				Ensaio de competição	(174)
					TR-FRET	(174)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.				Induz CYP 2B1	Ensaio radiométrico	(177)
<i>Salvia officinalis</i> L.	PPAR γ	Sim			Western blot	(186)
	PPAR γ	Sim			Ensaio de gene repórter	(187)
				Inibe CYP 2C9, 2C19, 2D6, 3A4	Ensaio de gene repórter	(174)
<i>Sambucus nigra</i> L.	PPAR α, β, γ	Sim		Induz CYP 2E1	CLAE	(170)
<i>Taraxacum officinale</i> Weber					Western Blot	(188)
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) D.C.	ER	Sim		Inibe CYP 2E1, 1A2	Ensaio de gene repórter	(189)
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe				Inibe CYP 3A4	Ensaio de ligação	(191)
	ER	Sim			Ensaio fluorométrico	(155)
				Inibe CYP3A4	Ensaio de atividade estrogênica	(192)
				Inibe CYP 2C9, 2C19, 2D6, 3A4	Ensaio de atividade estrogênica	(193)
					CLAE	(170)

Considerando que há, ainda, muito que se pesquisar sobre as interações medicamentosas entre drogas vegetais e medicamentos, principalmente no que tange à ativação do receptor de pregnanos X, responsável por induzir os genes da família CYP3A – uma das enzimas responsáveis por biotransformar alguns fármacos conhecidos, este projeto teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos do uso de drogas vegetais no receptor de pregnanos X de espécies contidas na RDC 10/10 da Anvisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos agonistas no receptor de pregnanos X (PXR) de algumas espécies contidas na RDC 10/10 da Anvisa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da citotoxicidade dos extratos em células HeLa
- Investigação do efeito agonista dos extratos vegetais em receptores nucleares PXR
- Investigar a especificidade das amostras estudadas para o PXR

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO DERIVADO VEGETAL

A definição das espécies estudadas baseou-se nos critérios de estarem contidas na RDC 10/10 e para as quais não houvesse estudos em receptores nucleares PXR. Foram selecionadas nove espécies de plantas (**Tabela 4**) presentes no anexo da RDC 10/10 da Anvisa, que foram adquiridas em farmácias e drogarias de Brasília-DF sob a forma de sachês de 20 g. Das drogas vegetais foram preparados chás pelo método de infusão, decocção ou maceração (**Tabela 4**) de acordo com orientação de uso informados no anexo da RDC 10/10. Após serem congelados, os chás foram submetidos à secagem pelo método da liofilização e armazenados a 20 °C para posterior utilização.

Tabela 4 - Resumo de drogas vegetais utilizadas nos ensaios biológicos.

Espécie vegetal	Nome popular	Massa*	Método de preparação
<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC	Macela	1,5	Infusão
<i>Bidens pilosa</i> L.	Picão preto	2,0	Infusão
<i>Citrus aurantium</i> L.	Laranja amarga	2,0	Maceração
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	Capim limão	3,0	Infusão
<i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	Chapéu de couro	1,0	Infusão
<i>Malva sylvestris</i> L.	Malva	2,0	Infusão
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. Ex Reissek	Espinheira santa	2,0	Infusão
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	Guaco	3,0	Infusão
<i>Rhamnus purshiana</i> DC	Cáscara sagrada	0,5	Decocção

*Quantidade usada para a preparação dos derivados vegetais em gramas por 150mL de água

3.2 CULTURA DE CÉLULAS HELA

Para os ensaios de gene repórter e de viabilidade celular – ensaios do MTT) foram utilizadas células HeLa (carcinoma do colo do útero humano) obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas-VA, EUA). As células foram cultivadas de acordo com método descrito por Chiellini *et al.*, (194). Essas células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), contendo 10% de

soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina, e mantidas em placas Corning® de 148 cm² em incubadoras a 37 °C e 5% de CO₂.

3.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS EM CÉLULAS HELA

Com o objetivo de definir a viabilidade das células HeLa expostas ao tratamento com os extratos vegetais preparados, foi utilizado o ensaio colorimétrico segundo o método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT; SIGMA-ALDRICH®). O anel de tetrazólio presente no sal brometo de MTT, de coloração amarelada, é clivado por desidrogenases presentes na mitocôndria das células viáveis, formando cristais de formazana, de coloração azulada (195). Portanto, é considerado que a quantidade de células viáveis é proporcional à quantidade de cristais de formazana formada. No ensaio, com exceção dos poços utilizados para o controle do teste (branco), todos os outros poços das placas foram semeados com 30.500 células HeLa em meio de cultura DMEM. O volume final foi de 100 µL. Após incubação de 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS)) em todos os poços das placas, e as mesmas foram incubadas por 4 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Para a dissolução do sal de formazana, o meio de cultura foi retirado dos poços e 100 µL de solução reveladora de MTT [HCl (Sigma) 0,04 M em isopropanol absoluto (Vetec)] foram adicionados. As placas foram deixadas sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 570 nm em leitor de placas Beckman Coulter DTX 800. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis nos poços tratados com os extratos em relação aos controles (100%). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição.

3.4 ENSAIO DE TRANSATIVAÇÃO (TRANSFEÇÃO TRANSITÓRIA POR ELETROPORAÇÃO E ENSAIO DE GENE REPÓRTER) EM CÉLULAS HELA

O gene repórter consiste de um promotor ligado ao gene repórter de interesse no qual a região promotora liga-se aos fatores de transcrição. Para evitar a interferência de fatores endógenos de células de mamíferos e ainda avaliar o efeito de ligantes isoladamente sobre o LBD do PXR, nos experimentos realizados neste trabalho foram utilizados vetores quiméricos contendo o DBD do fator de transcrição de leveduras GAL-4.

No presente trabalho foram utilizados os ensaios de gene repórter da luciferase. A luciferase catalisa a oxidação da luciferina a oxiluciferina resultando em emissão de luz que por vez será quantificado em luminômetro. A luz emitida fornece uma indicação da atividade de transcrição do gene (196).

3.4.1 Plasmídeos

Foram utilizados cinco plasmídeos de expressão para os ensaios de transfecção e ensaio de gene repórter. O plasmídeo quimérico contendo o LBD do PXR fusionado ao DBD do fator de transcrição de levedura Gal-4 (pM-hPXRLBD (GAL-4)) foi gentilmente cedido pelo Dr. Junji Magae (Nuclear Technology Research Laboratory, Central Research Institute of Electric Power Industry, Tóquio, Japão). O plasmídeo pCMV-TAG2B-hTR β 1WT e o pCMVLUC foram cedidos pela professora Marie Togashi e o plasmídeo químero LBD do PPAR γ fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL-4 (pBIND-PPAR γ) e o plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase dirigido pelo promotor mínimo do adenovírus E1b e por sua sequência de cinco sítios de ligação do Gal-4 (UAS_{5x}-LUC) foram cedidos pelo Prof. Dr. Paul Webb.

3.4.2 Transformação e purificação dos plasmídeos

Para a replicação dos plasmídeos de interesse, foi realizada a transformação que é a introdução de um plasmídeo em uma célula procariótica, utilizando a cepa de bactéria *Echerichia coli*, cepa DH5 α .

Em um tubo de microcentrífuga, 100 a 1000 ng do plasmídeo a ser transformado foram incubados com 50 μ L de *E. coli* DH5 α durante 30 minutos em

gelo. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico por 2 minutos em um banho-maria a 42°C e gelo por 2 minutos. Esse processo permitiu a entrada do plasmídeo na célula por meio da abertura de poros na parede celular da bactéria. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de meio de cultura LB (5 g de extrato de levedura, 10 g de triptona e 10 g de NaCl em 1 L de água destilada) sem antibiótico. Essa cultura celular foi incubada por 1 hora em estufa a 37 °C sob agitação constante. Após esse período, 50 µL da suspensão de *E. coli* transformada foram semeados em uma placa de Petri contendo meio de cultura LB com 1,5% de ágar e 0,1 mg/mL de ampicilina, por 16 horas em estufa a 37 °C. As células transformadas que expressaram o gene da resistência formaram colônias e foram selecionadas para posterior purificação.

A colônia resistente selecionada foi submetida a um período de crescimento sendo cultivada em 5 mL de meio LB, contendo 50 µg/mL de ampicilina por 4 a 6 horas a 37 °C sob agitação. Em seguida, essas bactérias foram inoculadas em 400 mL do meio de cultura LB descrito acima e incubadas por 16 horas a 37 °C, sob agitação. Ao término desse período, as bactérias foram separadas por centrifugação a 5059 x g por 20 min a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. Os plasmídeos foram purificados a partir do precipitado de células utilizando-se o *Quiagen Plasmid Maxi Kit*[®].

3.4.3 Ensaio de gene repórter por meio da transfecção transiente

O método de eletroporação foi utilizado para a transfecção transiente. Esse método consiste na aplicação de pulso de corrente elétrica a uma suspensão de células para gerar poros na membrana plasmática e nuclear e assim permitir a entrada do DNA plasmidial de interesse.

Para o ensaio da transfecção, células HeLa foram coletadas por meio da centrifugação (2.000 rpm por 5 minutos) e ressuspendidas em solução PBS contendo 0,1% de dextrose e 0,1% de cloreto de cálcio, para obtenção de uma concentração de 10⁷ células/mL. 500 µL da solução de células foram transferidas para uma cubeta e submetidas à eletroporação (Gene Pulser II - Bio-Rad[®]) nas condições de 240 mV e 950 µF. Após a eletroporação, as células foram transferidas para o meio de cultura, distribuídas em placas de 12 poços (Corning[®]) (1 mL por

poço) e tratadas. Para transfecções com pM-hPXR, as células foram tratadas com veículo (vcl) (EtOH:DMSO 1:2), e com os controles positivos rifampicina 10^{-5} M, clotrimazol 10^{-5} M e 150 µg/mL de erva de São João (*Hipericum perforatum*) ou com os extratos obtidos das drogas vegetais em estudo em diferentes concentrações e mantidas por 24 horas de incubação a 37 °C e CO₂ 5%. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e a cada poço foi adicionado 100 µL tampão de lise 1X (Promega®).

3.4.4 Cálculo da taxa de ativação da transcrição

A taxa de ativação da transcrição é a razão entre atividade (leitura da luciferase) das células tratadas com os agonistas (controle positivo) ou extratos e a atividade (leitura da luciferase) das células tratadas com o veículo (vcl) (EtOH:DMSO 1:2). Convencionando a taxa de ativação das células tratadas com veículo igual a 1 (um).

$$\text{Taxa de ativação} = \frac{\text{Leitura da luciferase (ligante sintético ou natural ou extrato)}}{\text{Leitura da luciferase (células tratadas com veículo)}}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DOS DERIVADOS VEGETAIS

Tabela 5 - Rendimento dos extratos vegetais.

Espécie vegetal	Nome popular	Rendimento (%)
<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC	Macela	4,3
<i>Bidens pilosa</i> L.	Picão preto	12,4
<i>Citrus aurantium</i> L.	Laranja amarga	15,0
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	Capim limão	16,6
<i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	Chapéu de couro	16,7
<i>Malva sylvestris</i> L.	Malva	12,7
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. Ex Reissek	Espinheira santa	13,5
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	Guaco	9,8
<i>Rhamnus purshiana</i> DC	Cáscara sagrada	2,3

4.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS VEGETAIS POR MEIO DO ENSAIO DO MTT.

Os ensaios de citotoxicidade avaliam a interferência de agentes nos processos metabólicos das células no que diz respeito ao crescimento e ainda morte. São de baixo custo, reproduzíveis e muito utilizados como forma de triagem (197).

Os ensaios do MTT para determinação da citotoxicidade dos derivados vegetais, realizados neste trabalho, tiveram o objetivo de definir a máxima concentração de cada espécie vegetal a ser utilizada nos ensaios de gene repórter. De acordo com este ensaio, o sal amarelo, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é absorvido pelas células e no interior da célula sofre redução pela enzima succinato desidrogenase formando assim cristais azuis de formazana que podem ser analisados por espectrofotometria UV/VIS (195). Os resultados estão apresentados nas **Figuras 7 e 8**.

Por meio do ensaio do MTT, as espécies *Cymbopogon citratus*, *Echinodorus macrophyllus*, *Maytenus ilicifolia* apresentaram diminuição significativa da viabilidade das células HeLa em concentrações a partir de 180 µg/mL após 24 horas de tratamento (**Figura 7**). Por esse motivo as concentrações de 150 µg/mL foram

adotadas para os ensaios de gene repórter. Nestas concentrações, as porcentagens de viabilidade celular após o tratamento com os extratos vegetais de *C. citratus*, *E. macrophyllus* e *M. ilicifolia* foram de 77,8%, 79,3% e 88,2%, respectivamente. Já a espécie *Rhamnus purshiana* apresentou diminuição da viabilidade das células HeLa apenas em concentrações acima de 500 $\mu\text{g/mL}$ sendo a de 400 $\mu\text{g/mL}$ que correspondeu a 89,5% de viabilidade celular (**Figura 7**).

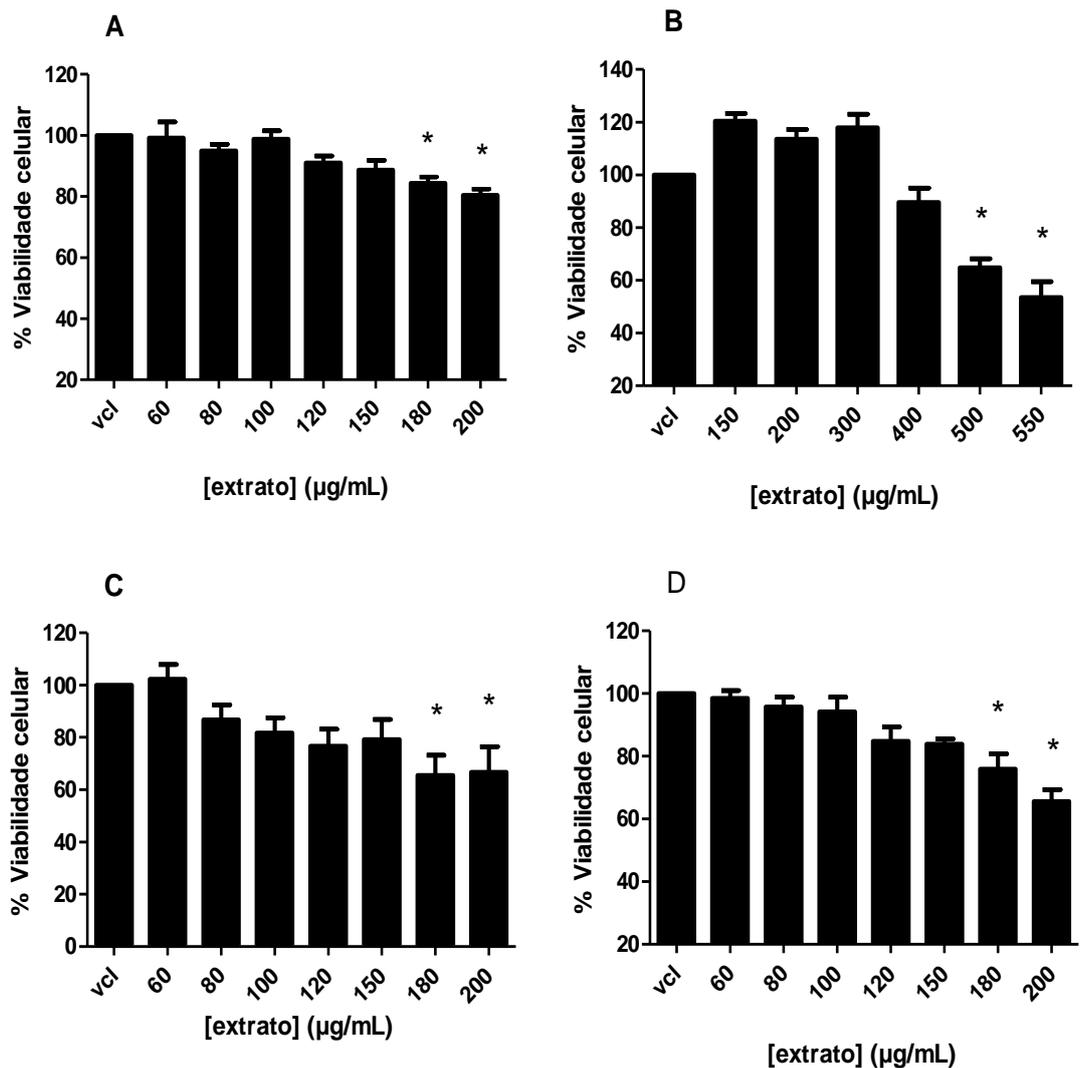


Figura 7 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos aquosos de *Cymbopogon citratus* (Capim limão) (A); *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) (B); *Echinodorus macrophyllus* (Chapéu de couro) (C); *Maytenus ilicifolia* (Espinheira santa) (D). As células HeLa foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos e com o veículo (vcl) e, em seguida, foram incubadas com MTT. Os resultados representam a média \pm erro médio, de no mínimo três experimentos, da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extrato, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%. * $P < 0,05$ vs veículo.

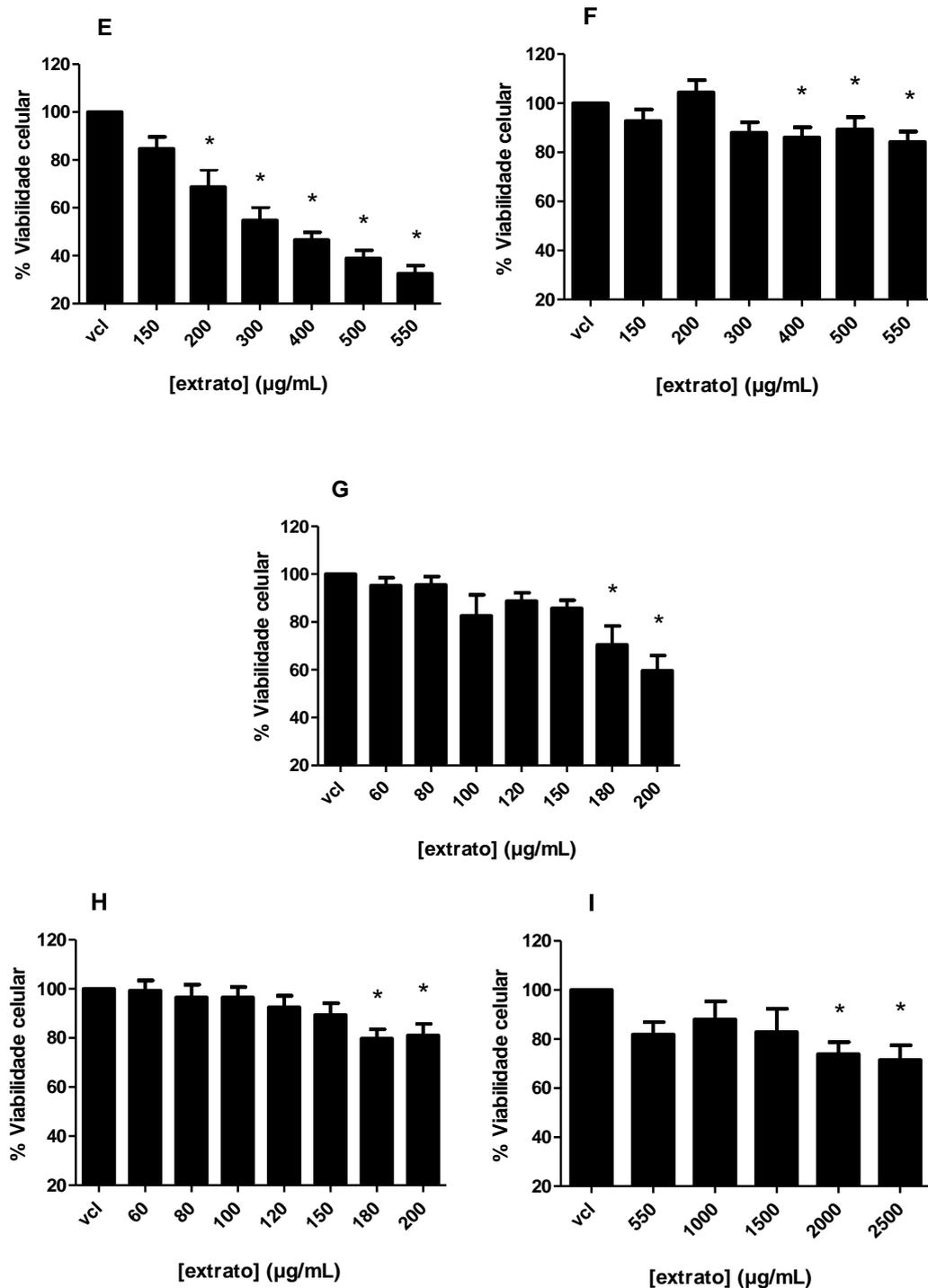


Figura 8 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos aquosos de *Mikania glomerata* (Guaco) (E); *Citrus aurantium* (Laranja amarga) (F) *Achyrocline satureioides* (Macela) (G); *Bidens pilosa* (Picão preto) (H); *Malva sylvestris* (Malva) (I). As células HeLa foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos e com o veículo (vcl) e, em seguida, foram incubadas com MTT. Os resultados representam a média \pm erro médio de no mínimo três experimentos, da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extrato, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%. * $P < 0,05$ vs veículo.

No estudo das espécies *Mikania glomerata* e *Citrus aurantium* a diferença significativa de viabilidade celular em relação ao controle (vcl) deu-se nas concentrações de 200 µg/mL e 400 µg/mL respectivamente (**Figura 8**).

Consequentemente, concentrações de escolha para os ensaios de gene repórter foram 150 µg/mL e 300 µg/mL, respectivamente para *M. glomerata* e *C. aurantium* as quais correspondem a 84,7% e 88,0% de células viáveis. As espécies *Achyrocline satureioides* e *Bidens pilosa* apresentaram diminuição de viabilidade celular a partir da concentração de 180 µg/mL sendo então escolhidas a concentração anterior estudada (150 µg/mL) que correspondem a 85,7% e 89,4% de viabilidade celular, respectivamente para *A. satureioides* e *B. pilosa*. Já a *Malva sylvestris* foi a espécie que somente a partir da concentração de 2.000 µg/mL apresentou baixa na taxa de viabilidade celular, sendo então escolhida a concentração anterior estudada (1.500 µg/mL) que correspondeu a 88,4% de células viáveis. Observou-se para todos os extratos um comportamento de diminuição de viabilidade celular de forma concentração-dependente. Desta forma, concentrações determinadas para os ensaios de gene repórter foram as que corresponderam a mais de 70% de viabilidade celular quando comparadas ao veículo (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Resumo das viabilidades celulares dos extratos vegetais por meio do ensaio do MTT.

Espécie vegetal	Extrato (µg/mL)	Viabilidade celular (%)
<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC	150	85,7
<i>Bidens pilosa</i> L.	150	89,4
<i>Citrus aurantium</i> L.	300	88,0
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	150	77,8
<i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	150	79,3
<i>Malva sylvestris</i> L.	1500	88,4
<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. Ex Reissek	150	88,2
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	150	84,7
<i>Rhamnus purshiana</i> DC	400	89,5

4.3 ESTUDO DO EFEITO AGONISTA DOS DERIVADOS VEGETAIS NO RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR) POR MEIO DO ENSAIO DE GENE REPÓRTER - SISTEMA GAL4/GAL4RE

A regulação gênica é de fundamental importância tanto para determinar condições normais quanto patológicas nos organismos de mamíferos e a fusão de elementos regulatórios a genes repórteres têm sido bastante utilizadas, principalmente em modelos *ex vivo* (198). Para a investigação de possíveis efeitos agonistas de nove derivados vegetais constantes na RDC 10/10 no receptor nuclear PXR, foi utilizado o ensaio de gene repórter. Os resultados estão apresentados nas **Figuras 9 a 18**.

Os genes repórteres são frequentemente utilizados como indicadores de atividade transcricional ou de ativação das vias de sinalização dentro das células eucarióticas. Os ensaios que utilizam esses genes repórteres são considerados versáteis e confiáveis e este método está cada vez mais sendo utilizado na pesquisa de novos ligantes obtidos de plantas medicinais (199).

4.3.1 Controles positivos sintéticos (rifampicina e clotrimazol) e natural (*Hypericum perforatum*) - agonistas de PXR.

Foram realizadas curvas dose-respostas de alguns compostos sintéticos já relatados por sua ligação e ativação do PXR humano, como é o caso da rifampicina e o clotrimazol. Segundo Song *et al* (2004), a rifampicina produz ativação dose-dependente neste receptor, tendo sua maior ativação na concentração de 10^{-5} M fato que foi observado e confirmado em nossos ensaios (**Figura 9**) (200). Luo *et al*, (2000) determinaram a concentração de maior ativação do antimicótico clotrimazol, outro conhecido ligante do PXR, também na concentração de 10^{-5} M (201), que foi confirmado em nossos ensaios (**Figura 9**). O *Hypericum perforatum* é uma mistura de constituintes no qual a hiperforina se destaca como principal responsável pela atividade anti-depressiva desta planta medicinal e também como a responsável pela ativação do PXR (202). Em nossos estudos, quando comparada aos outros ligantes, a *H. perforatum*, apresentou taxas mais elevadas de ativação de PXR. Devido ao conhecimento dos efeitos destes compostos no receptor PXR, estes foram adotados como controles positivos para posteriores ensaios de gene-repórter para avaliação do efeito das drogas vegetais em PXR.

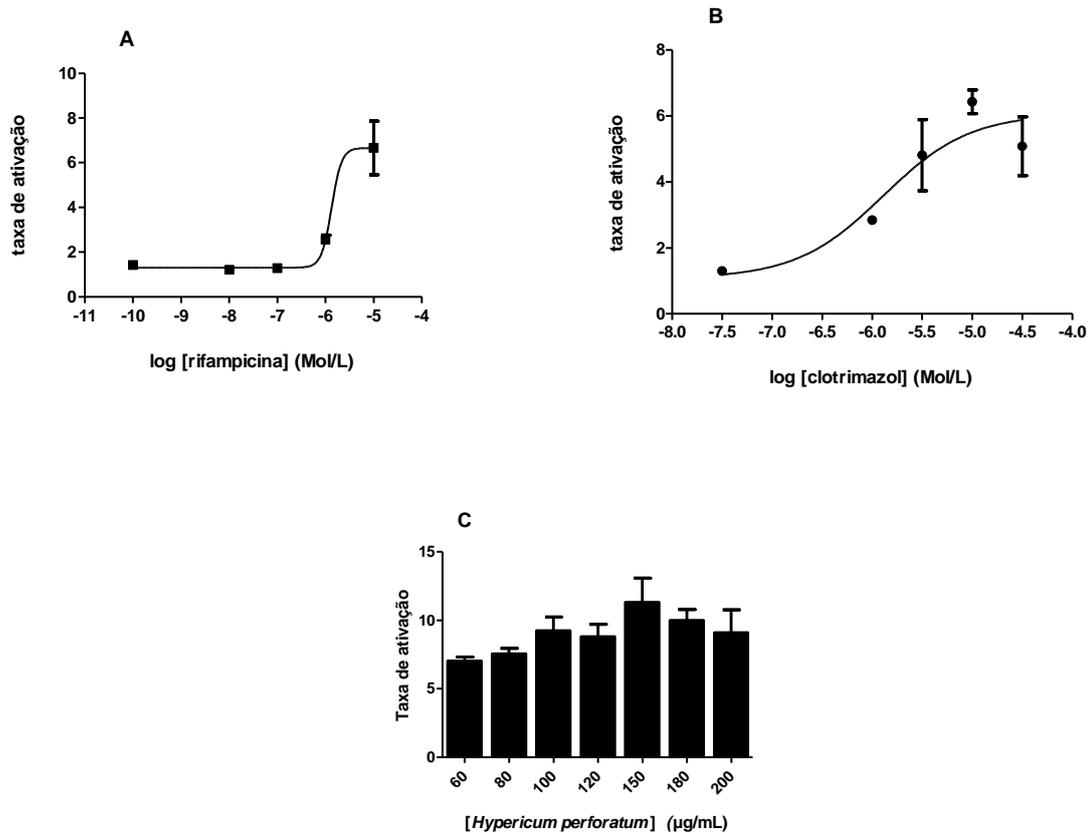


Figura 9 - Curvas dose-respostas dos controles positivos sintéticos rifampicina (A) e clotrimazol (B) e efeito dose-dependente do ligante natural *Hypericum perforatum* (C) em PXR. Células HeLa foram co-transfectadas com 2µg de PMhPXR/LBD GAL4 e 4 µg de GAL4RE. As células foram tratadas por 24 horas com concentrações crescentes dos controles positivos. A atividade da luciferase foi então mensurada. Os resultados apresentados são a média ± erro padrão de, no mínimo, três experimentos.

4.3.2 Estudo do efeito dos extratos aquosos de *Echinodorus macrophyllus*, *Bidens pilosa*, *Achyrocline satureioides*, *Mikania glomerata*, *Rhamnus purshiana*, *Maytenus ilicifolia*, *Citrus aurantium*, *Cymbopogon citratus* e *Malva sylvestris* em vetores de expressão pM .

Apesar de muitas das vezes os componentes químicos presentes em plantas medicinais não serem ligantes tão eficientes quanto os compostos sintéticos, estas ainda constituem-se como rica fonte de ligantes de receptores nucleares. Com exceção da espécie *Citrus aurantium* que já foi estudada em receptores nucleares PPAR α (203), não há, até onde vai nosso conhecimento, relatos sobre o estudo das oito espécies anteriormente citadas quanto ao seu efeito em receptores nucleares

PPAR, GR, ER, TR e PXR, o que motivou a escolha dos mesmos. Para iniciar os estudos com o receptor nuclear PXR, foram realizados ensaios de gene repórter, com o vetor repórter, e com o vetor de expressão contendo somente o DBD do Gal4 (pM), desta forma, certificando-nos de que a ativação transcricional observada é decorrente da ativação do LBD do PXR.

Foram utilizados os vetores pM-hPXR-LBD, de forma a gerar a proteína fundida GAL4DBD-hPXRLBD, e o vetor repórter GAL4RE (contendo a região de reconhecimento do GAL4DBD clonadas ao gene repórter luciferase). Desta forma, a intenção desse ensaio foi avaliar se os ligantes iriam ligar-se ao LBD do PXR.

As **Figuras 10, 11 e 12** mostram os resultados do efeito desses extratos vegetais nos ensaios de gene repórter. Os resultados mostraram que o DBD do GAL4 não tem atividade transcricional na presença dos extratos vegetais, não sendo estatisticamente diferente do controle negativo - veículo (vcl).

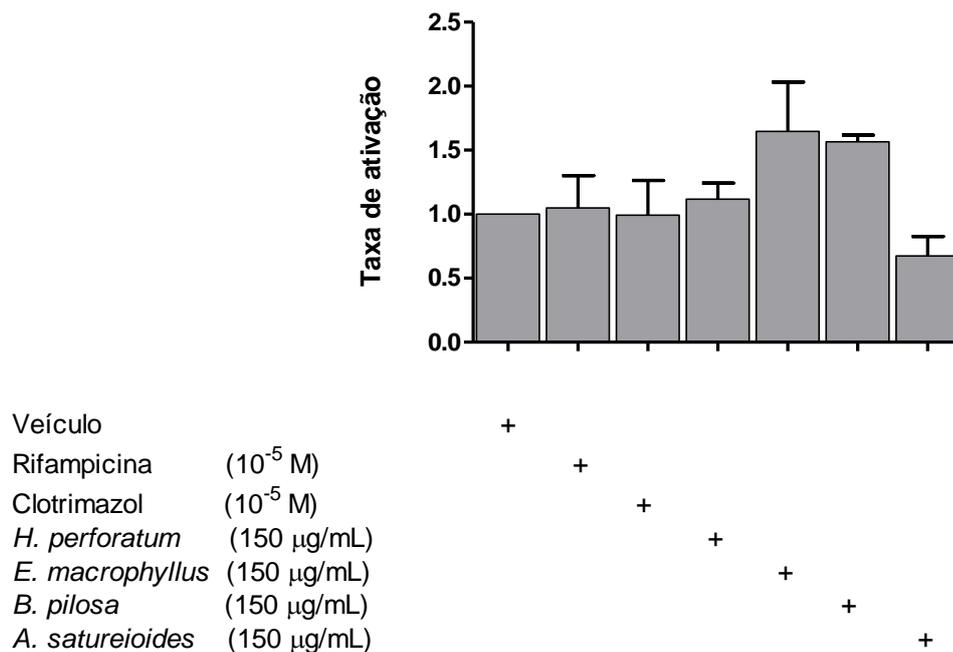


Figura 10 - Não há atividade transcricional por GAL4-DBD na presença dos extratos (*E. macrophyllus*; *B. pilosa*; *A. satureioides*) e ligantes. Células HeLa foram transfectadas com 2µg de pM e 4µg de vetor repórter GAL4RE e tratadas com ligantes sintéticos e extratos durante 24 horas. Os dados são expressos como média ± erro médio de ativação da transcrição em relação ao veículo.

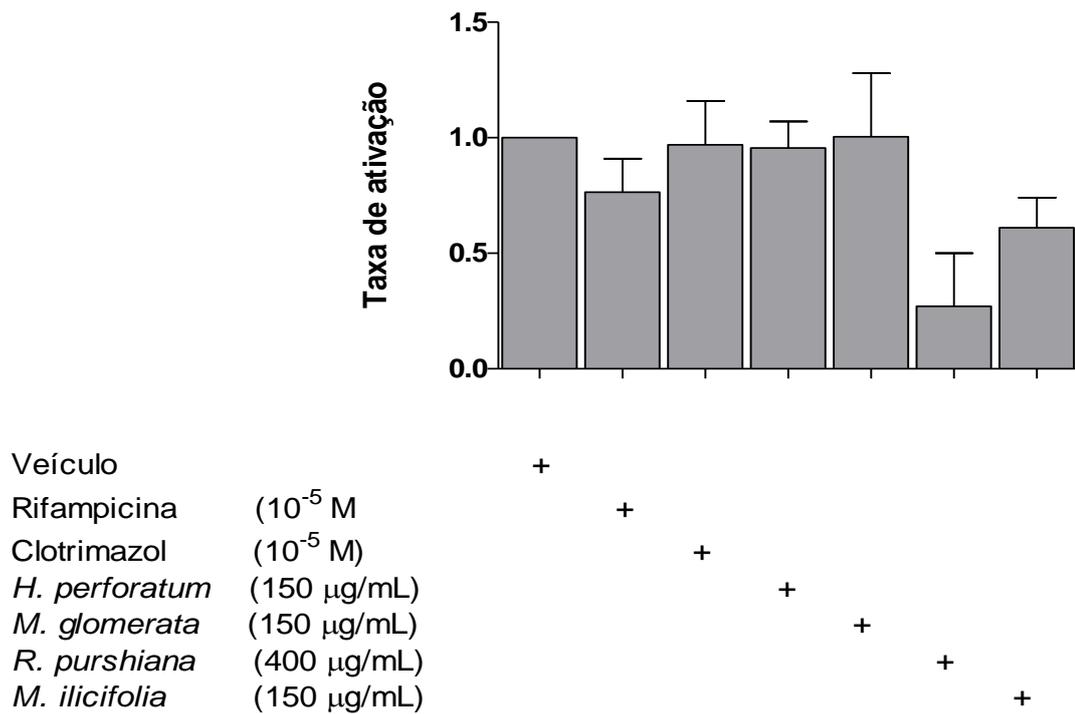


Figura 11 - Não há atividade transcricional por GAL4-DBD na presença dos extratos (*M. glomerata*; *R. purshiana*; *M. ilicifolia*) e ligantes. Células HeLa foram transfectadas com 2µg de pM e 4µg de vetor repórter GAL4RE e tratadas com ligantes sintéticos e extratos durante 24 horas. Os dados são expressos como média ± erro médio de ativação da transcrição em relação ao veículo.

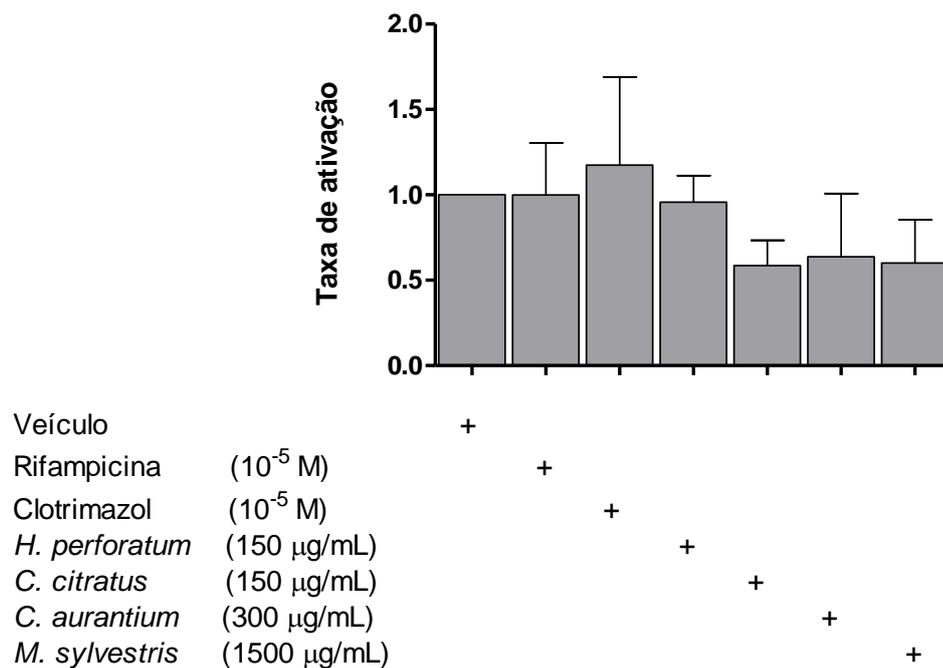


Figura 12 - Não há atividade transcricional por GAL4-DBD na presença dos extratos (*C. citratus*, *C.aurantium*; *M. sylvestris*) e ligantes. Células HeLa foram transfectadas com 2µg de pM e 4µg de vetor repórter GAL4RE e tratadas com ligantes sintéticos e extratos durante 24 horas. Os dados são expressos como média ± erro médio de ativação da transcrição em relação ao veículo.

Os vetores de expressão pM são moléculas de DNA que transportam o receptor nuclear PXR. Os resultados sugerem que não houve diferença estatística entre as ativações dos extratos vegetais e o controle negativo (veículo - vcl) confirmando que na ausência do PXR não houve ativação estatisticamente significativa.

4.3.3 Estudo do efeito agonista de extratos aquosos de *Echinodorus macrophyllus*, *Bidens pilosa*, *Achyrocline satureioides*, *Mikania glomerata*, *Rhamnus purshiana*, *Maytenus ilicifolia*, *Citrus aurantium*, *Cymbopogon citratus* e *Malva sylvestris* na ativação transcricional de PXR.

Os derivados vegetais obtidos de espécies contidas na RDC 10/10 foram submetidos à avaliação de seus efeitos na atividade transcricional em PXR. As **Figuras de 13 a 15** mostram os resultados desse estudo.

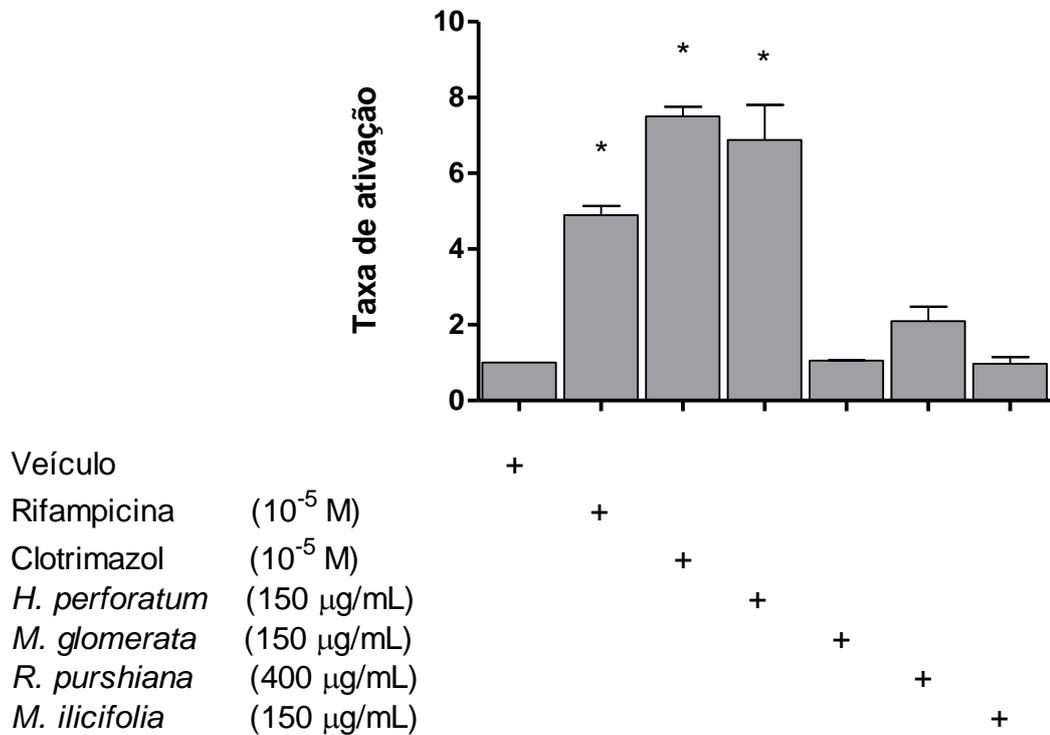


Figura 13 - Atividade transcricional do PMhPXR LBD GAL4 na presença dos ligantes sintéticos. Células HeLa foram transfectadas com 2µg de PXR e 4µg de vetor repórter GAL4RE e tratadas com ligantes sintéticos e extratos durante 24 horas. Os dados são expressos como média ± erro médio de ativação da transcrição em relação ao veículo. * $P < 0,05$ vs veículo.

As espécies *M. glomerata*, *R. purshiana* e *M. ilicifolia* foram submetidas ao ensaio de gene repórter a fim de avaliar seus efeitos nos receptores nucleares PXR. As concentrações testadas foram pré-determinadas por meio do ensaio de citotoxicidade do MTT e apresentaram média da taxa de ativação de 1,0; 2,0 e 0,9 respectivamente. Os resultados obtidos foram comparados ao controle negativo (veículo) e não apresentaram ativação significativa neste receptor o que sugere que estas espécies não possuem compostos capazes de agir como agonistas em receptores PXR.

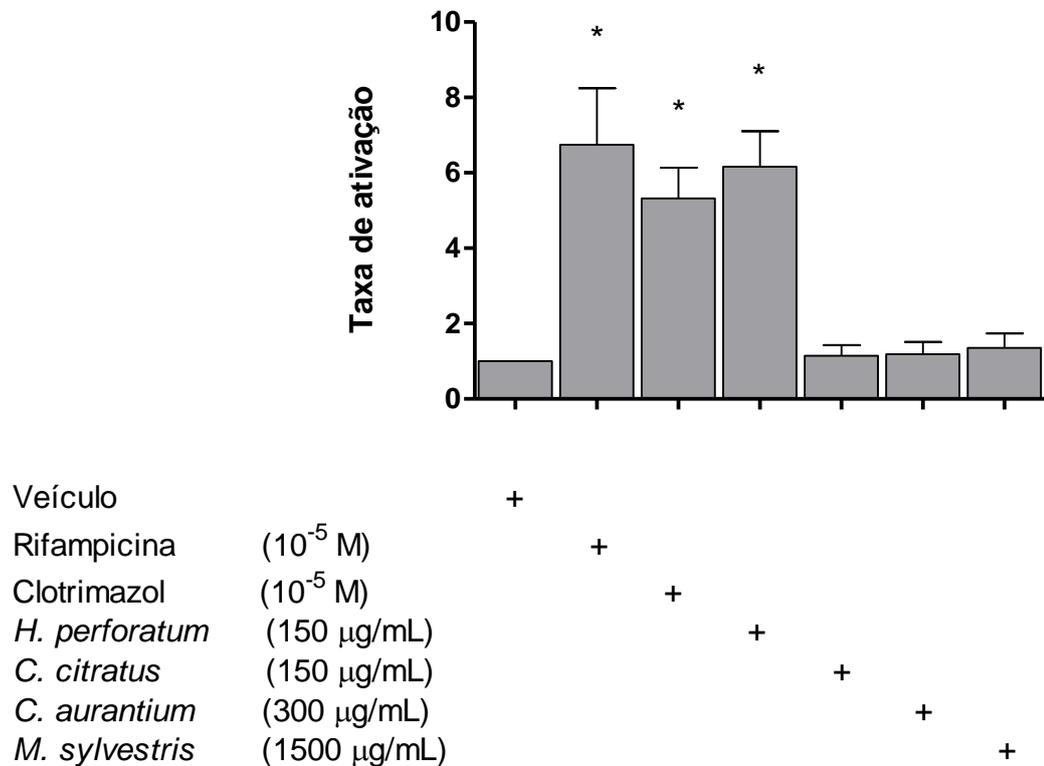


Figura 14 - Atividade transcricional do PMhPXR LBD GAL4 na presença dos ligantes sintéticos. Células HeLa foram transfectadas com 2µg de PXR e 4µg de vetor repórter GAL4RE e tratadas com ligantes sintéticos e extratos durante 24 horas. Os dados são expressos como média ± erro médio de ativação da transcrição em relação ao veículo. * $P < 0,05$ vs veículo.

As espécies *C. citratus*, *C. aurantium* e *M. sylvestris* não apresentaram ativação significativa no receptor nuclear PXR. Por meio do ensaio de gene repórter, as suas ativações foram, respectivamente, de 1,13; 1,5 e 1,3 quando comparadas ao controle negativo (veículo).

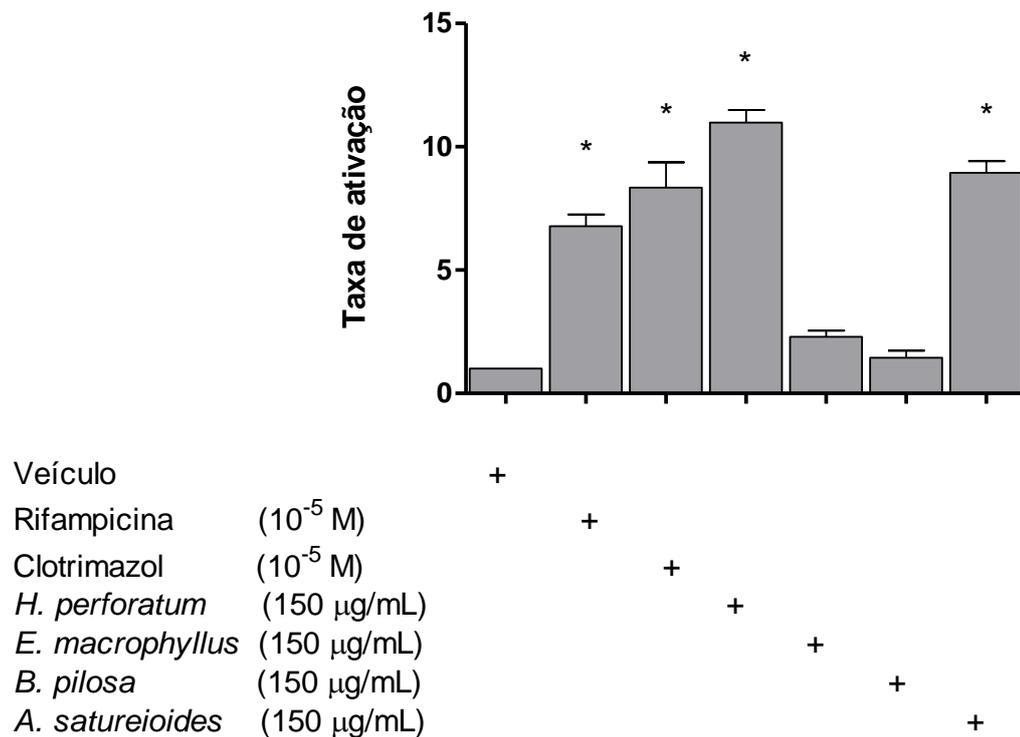


Figura 15 - Atividade transcricional por PMhPXR_{LBD} GAL4 na presença dos ligantes sintéticos e extrato de *A. satureioides*. Células HeLa foram transfectadas com 2µg de PXR e 4µg de vetor repórter GAL4RE e tratadas com ligantes sintéticos e extratos durante 24 horas. Os dados são expressos como média ± erro médio de ativação da transcrição em relação ao veículo. **P* < 0,05 vs veículo.

As espécies *E. macrophyllus* e *B. pilosa* apresentaram taxa de ativação de 2,23 e 1,42, respectivamente. Da mesma forma como os ensaios com as espécies anteriores, estes resultados sugerem a ausência de compostos capazes de exercerem ação agonista em PXR.

Dos nove extratos vegetais testados por meio do ensaio de gene repórter no receptor nuclear PXR, apenas o extrato de *A. satureioides* (macela) foi capaz de ativá-lo transcionalmente. Os resultados sugerem que há compostos nesta espécie que exercem efeito agonista em PXR. Como pode-se depreender da **Figura 15**, na concentração de 150 µg/mL, foi obtida uma taxa de ativação do PXR de 9,4 em relação à taxa de ativação do veículo padronizado em 1,0. A taxa de ativação obtida nos testes com esta espécie foi semelhante à dos ligantes sintéticos rifampicina e clotrimazol que foram de 8,33 e 6,75, respectivamente.

Até o presente e até onde vai nosso conhecimento não há relatos de ativação de PXR pela *A. satureioides*. Estes resultados são, portanto, inéditos para esta espécie.

Esta espécie, de ocorrência natural em todo o Brasil, é comumente encontrada em banca de raizeiros das feiras livres e está, por exemplo, entre as dez plantas medicinais mais utilizadas na população de Porto Alegre (RS) (204, 205). A constatação da ativação de PXR por *A. satureioides* e por conseguinte, a indução via este receptor da expressão das enzimas da CYP, principalmente a CYP3A4, envolvida na metabolização de fármacos é de grande importância para a saúde pública.

Já foram atribuídas às infusões desta espécie efeitos digestivo, anti-inflamatório e hipoglicêmico (206). Os compostos fenólicos representam uma das classes de constituintes bioativos presentes nesta espécie (207) e poderiam ser eles os responsáveis, ao menos em parte, pela ativação do PXR, uma vez que segundo Spencer *et al.* (2008), dentre os compostos fenólicos, os flavonoides são os mais consumidos na dieta dos seres humanos e recentemente foi demonstrada a indução da expressão da CYP pela ativação de efeitos transcricionais do PXR por esses compostos. As flavonas luteolina (17) e apigenina (4) e ainda a isoflavona genisteína estão entre eles. (130, 208).

4.3.4 Efeito dose-dependente da *A. satureioides* na ativação de PXR

Uma vez que a *A. satureioides* apresentou ativação do receptor nuclear PXR, estudos foram realizados para observar se o efeito era dose-dependente. As crescentes concentrações da droga vegetal utilizada para este ensaio foram referentes às concentrações testadas anteriormente para a mesma espécie nos ensaios do MTT com a finalidade de assegurar a viabilidade celular. Os resultados sugerem uma ação dose-dependente do extrato no receptor PXR (**Figura 16**). A maior resposta deu-se na concentração de 150 µg/mL corroborando com os resultados anteriores (**Figura 15**)

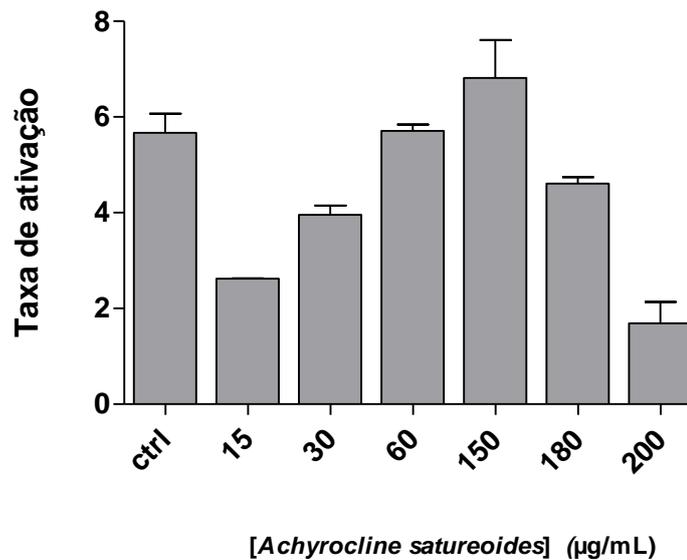


Figura 16 - Efeito dose-dependente da *A. saturoioides* na ativação transcricional de PXR. Células Hela foram co-transfectadas com 2µg de PMhPXRLBD GAL4 e 4 µg de GAL4RE. As células foram tratadas por 24 horas com concentrações crescentes de *A. saturoioides*. A atividade da luciferase foi então mensurada. Cada ponto representa a média ± erro padrão de três experimentos diferentes. Controle positivo - Rifampicina (10^{-5} M).

Considerando que 1 xícara de chá de macela corresponde a 64,5 mg de extrato aquoso liofilizado e que uma dose de 15×10^{-3} mg é capaz de promover 50% de ativação do PXR em relação ao controle, a ingestão concomitante de 35 µL de chá de macela (menos de uma colher de café, que corresponde em média a 2,5 mL) com fármacos que são metabolizados por enzimas do tipo CYP3A4 (e via PXR), apresenta potencial de interação que pode interferir com os resultados esperados para a farmacoterapia. De acordo com Luo *et al.*, fármacos como clotrimazol, fenobarbital, rifampina, sulfinopirona ativam fortemente o PXR e aumentam a atividade da CYP3A4; carbamazepina, dexametazona, t-butilacetato de dexametazona, fenitoina, sulfamidina e taxol também ativam o PXR, mas fracamente, induzindo também a atividade da CYP3A4. Por outro lado, os mesmos autores relatam que os fármacos ritonavir (anti-retroviral) e troleandomicina (antibiótico macrocíclico) apresentam uma expressiva ativação do PXR mas não aumenta (no caso da troleandomicina) ou diminui significativamente (no caso do ritonavir), a atividade da CYP3A4 microsossomal(201).

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho e em relatos sobre a relação de PXR e o metabolismo de fármacos, é possível inferir que a utilização concomitante de chá de macela com outros fármacos deve ser evitada,

principalmente em pacientes submetidos a regime de polifarmácia, no qual a possibilidade de interação fármaco-fármaco é existente e a probabilidade de iatrogenia é alta.

4.3.5 Ação do extrato vegetal de *A. saturoioides* em receptores nucleares PPAR γ e TR β por meio do ensaio de gene repórter.

A fim de dar continuidade à avaliação da provável especificidade de interação da *A. saturoioides* pelo receptor PXR, foram realizados testes subsequentes de gene repórter desta espécie vegetal em receptores nucleares PPAR γ (**Figura 17**) e TR β (**Figura 18**). Para estes receptores, todos os respectivos controles positivos apresentaram atividade transcricional estatisticamente diferente do veículo.

Os resultados não mostraram ativação dos receptores nucleares, tanto em PPAR quanto TR β conforme pode-se depreender das figuras 17 e 18, o que sugere uma possível especificidade de *A. saturoioides* como agonista de PXR.

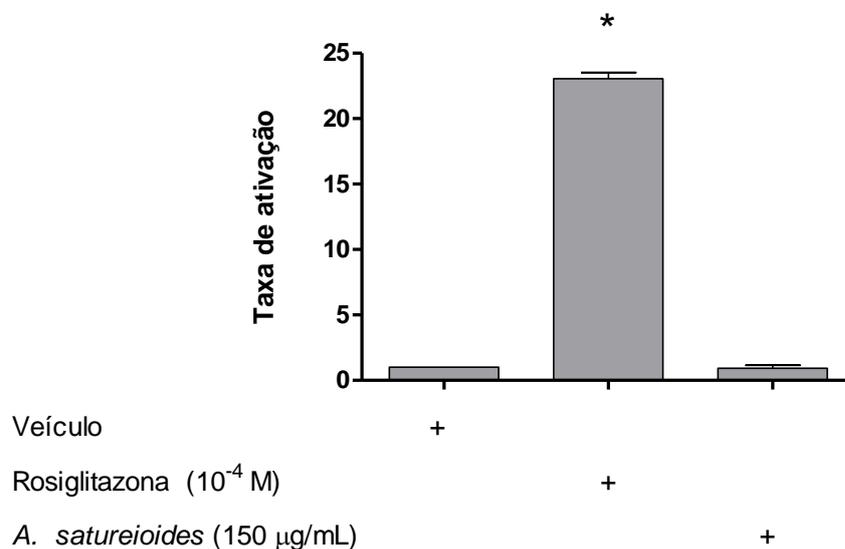


Figura 17 - Não há atividade transcricional por PPAR γ na presença de *A. saturoioides*. Células HeLa foram transfectadas com 1,5µg de PPAR-GAL4 e 3µg de seu repórter GAL-4RE e tratadas com o ligante sintético rosiglitazona 10⁻⁴ M durante 24 horas. Os dados são expressos como média ± erro médio de ativação da transcrição em relação ao veículo. **P* < 0,05 vs veículo.

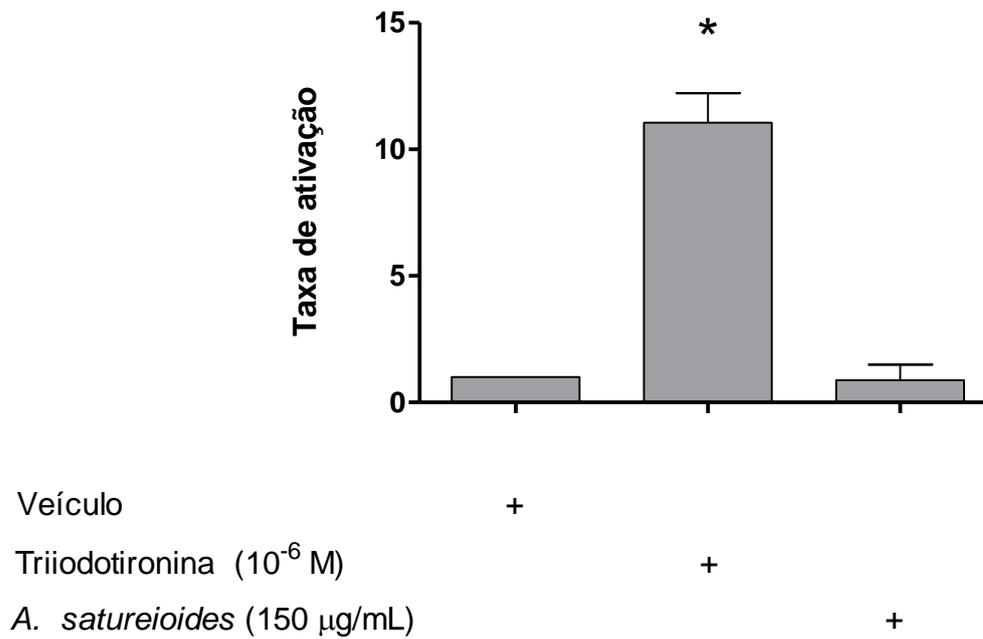


Figura 18 - Não há atividade agonista da espécie *A. saturoioides* em TR β 1 *wild type*. As células HeLa foram transfectadas com 1 μ g de TR β e 4 μ g de seu repórter F2-LUC e tratadas com os ligantes sintéticos T₃ 10^{-6} M - ctrl 1, durante 24 horas. Os dados são expressos como média de ativação da transcrição em relação ao veículo (controle). * $P < 0,05$ vs veículo.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O conhecimento de possíveis interações entre plantas medicinais e fármacos de uso clínico é importante para o profissional da saúde que prescreve e orienta o paciente quanto à Fitoterapia, pois sabe-se que em nível molecular, a eficácia dos fármacos tanto de origem natural quanto sintética está intimamente associada à ação de enzimas e receptores, ligação ao DNA, RNA e proteínas presentes em nosso organismo.

O uso de plantas medicinais em nosso país é uma prática bem aceita e por isso bastante popular, portanto, para assegurar seu uso seguro e eficaz, são necessários estudos em receptores nucleares, em particular o PXR por se tratar de receptor indutor de enzimas que estão intimamente envolvidos na metabolização destes xenobióticos. Esses estudos têm como finalidade gerar informações sobre possíveis interações medicamentosas entre fármacos prescritos e drogas vegetais utilizadas pela população.

Os resultados alcançados nesta dissertação mostram que das nove espécies estudadas, apenas o extrato obtido por infusão de sumidades floridas da espécie vegetal *Achyrocline satureioides*, na concentração de 150 µg/mL, possui composto (ou compostos) capaz de agir como agonista do receptor nuclear PXR de forma dose-dependente. Foi observado o efeito específico para o PXR dentre os receptores que foram testados. Até onde vai nosso conhecimento, interações medicamentosas envolvendo *A. satureioides* não foram relatadas.

Desta forma, este trabalho constitui-se como base prospectiva tanto para estudos posteriores de outras drogas vegetais (principalmente as contidas na RDC 10/10 da Anvisa) quanto para aprofundamento do estudo da própria *A. satureioides* em relação a seu efeito sobre a enzima que metaboliza xenobióticos - CYP3A4 -, verificando sua presença por meio de *western blotting* utilizando anticorpos específicos e ainda, no possível isolamento e identificação de compostos ativos da *A. satureioides* responsáveis pela ação no PXR.

6 REFERÊNCIAS

1. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. [Review]. 2001; Nov 30;294(5548):1866-70.
2. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Letters*. [Review]. 2008 Jan 9;582(1):2-9.
3. Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol*. [Review]. 2010 May;10(5):365-76.
4. Chen T. Nuclear receptor drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*. [Review]. 2008 Aug;12(4):418-26.
5. Faria CD, Longui CA. [Molecular aspects of glucocorticoid sensitivity]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. [Review]. 2006 Dec;50(6):983-95.
6. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*. [Review]. 2002 Feb 22;108(4):465-74.
7. Zhou G, Cummings R, Li Y, Mitra S, Wilkinson HA, Elbrecht A, et al. Nuclear receptors have distinct affinities for coactivators: characterization by fluorescence resonance energy transfer. *Molecular Endocrinology*. 1998 Oct;12(10):1594-604.
8. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*. [Review]. 2004 Nov;3(11):950-64.
9. Ingraham HA, Redinbo MR. Orphan nuclear receptors adopted by crystallography. *Curr Opin Struct Biol*. [Review]. 2005 Dec;15(6):708-15.
10. Watanabe M, Yanagisawa J, Kitagawa H, Takeyama K, Ogawa S, Arai Y, et al. A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *Embo J*. 2001 Mar 15;20(6):1341-52.
11. Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Klaholz B, Moras D. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell*. 2000 Jan;5(1):173-9.
12. Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol*. [Review]. 2007;69:201-20.

13. Zhou XE, Suino-Powell KM, Xu Y, Chan CW, Tanabe O, Kruse SW, et al. The orphan nuclear receptor TR4 is a vitamin A-activated nuclear receptor. *J Biol Chem.* 2011 Jan 28;286(4):2877-85.
14. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* [Review]. 2001 Jul;81(3):1269-304.
15. Metivier R, Reid G, Gannon F. Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep.* [Review]. 2006 Feb;7(2):161-7.
16. Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S, et al. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Molecular and Cellular Endocrinology.* [Review]. 2012 Jan 30;348(2):411-7.
17. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & Development.* [Review]. 2000 Jan 15;14(2):121-41.
18. Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *The Journal of Biological Chemistry.* [Review]. 2011 Feb 4;286(5):3177-84.
19. Trousson A, Grenier J, Fonte C, Massaad-Massade L, Schumacher M, Massaad C. Recruitment of the p160 coactivators by the glucocorticoid receptor: dependence on the promoter context and cell type but not hypoxic conditions. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2007 May;104(3-5):305-11.
20. Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Xaubet A, Cidlowski JA, et al. Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *American Journal of Physiology Cell Physiology.* 2002 Oct;283(4):C1324-31.
21. Jain A, Wordinger RJ, Yorio T, Clark AF. Spliceosome protein (SRp) regulation of glucocorticoid receptor isoforms and glucocorticoid response in human trabecular meshwork cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2012;53(2):857-66.
22. Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends in Cell Biology.* [Review]. 2006 Jun;16(6):301-7.
23. Tavares V, Hirata MH, Hirata RD. [Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia.* [Review]. 2007 Jun;51(4):526-33.

24. Rizzo G, Fiorucci S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*. [Review]. 2006 Aug;6(4):421-7.
25. Murphy GJ, Holder JC. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. [Review]. 2000 Dec;21(12):469-74.
26. Guan Y, Breyer MD. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney International*. [Review]. 2001 Jul;60(1):14-30.
27. Park CW, Zhang Y, Zhang X, Wu J, Chen L, Cha DR, et al. PPARalpha agonist fenofibrate improves diabetic nephropathy in db/db mice. *Kidney International*. 2006 May;69(9):1511-7.
28. Plutzky J. Preventing type 2 diabetes and cardiovascular disease in metabolic syndrome: the role of PPARalpha. *Diabetes & Vascular Disease Research* 2007 Sep;4 Suppl 3:S12-4.
29. van Bilsen M, van der Vusse GJ, Gilde AJ, Lindhout M, van der Lee KA. Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*. [Review]. 2002 Oct;239(1-2):131-8.
30. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Jul 19;91(15):7355-9.
31. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*. [Review]. 2006 Jun;110(3):371-85.
32. Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*. 2000 Dec 8;103(6):843-52.
33. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997 Dec;82(12):4258-65.
34. Hess RA, Gist DH, Bunick D, Lubahn DB, Farrell A, Bahr J, et al. Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *Journal of Andrology*. 1997 Nov-Dec;18(6):602-11.

35. Lindner V, Kim SK, Karas RH, Kuiper GG, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circulation Research*. 1998 Jul 27;83(2):224-9.
36. Harvey CB, Williams GR. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid*. [Review]. 2002 Jun;12(6):441-6.
37. Grover GJ, Mellstrom K, Malm J. Development of the thyroid hormone receptor beta-subtype agonist KB-141: a strategy for body weight reduction and lipid lowering with minimal cardiac side effects. *Cardiovasc Drug Rev*. 2005 Summer;23(2):133-48.
38. Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, et al. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*. 2000 Sep;141(9):3057-64.
39. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1097-142.
40. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010 Apr;31(2):139-70.
41. Jones I, Ng L, Liu H, Forrest D. An intron control region differentially regulates expression of thyroid hormone receptor beta2 in the cochlea, pituitary, and cone photoreceptors. *Mol Endocrinol*. 2007 May;21(5):1108-19.
42. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*. 1998 Jan 9;92(1):73-82.
43. Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, et al. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol*. 2000 Jan;14(1):27-39.
44. Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, et al. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol*. 2002 May;16(5):977-86.
45. Gardner-Stephen D, Heydel JM, Goyal A, Lu Y, Xie W, Lindblom T, et al. Human PXR variants and their differential effects on the regulation of human UDP-glucuronosyltransferase gene expression. *Drug Metab Dispos*. 2004 Mar;32(3):340-7.

46. Zhou C, Verma S, Blumberg B. The steroid and xenobiotic receptor (SXR), beyond xenobiotic metabolism. *Nucl Recept Signal*. [Review]. 2009;7:e001.
47. Wada T, Gao J, Xie W. PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. [Review]. 2009 Aug;20(6):273-9.
48. Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, et al. The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics*. 2001 Oct;11(7):555-72.
49. Matic M, Mahns A, Tsoli M, Corradin A, Polly P, Robertson GR. Pregnane X receptor: promiscuous regulator of detoxification pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. [Review]. 2007;39(3):478-83.
50. Zhang B, Xie W, Krasowski MD. PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. [Review]. 2008 Nov;9(11):1695-709.
51. Matic M, Corradin AP, Tsoli M, Clarke SJ, Polly P, Robertson GR. The alternatively spliced murine pregnane X receptor isoform, mPXR(delta171-211) exhibits a repressive action. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 May;42(5):672-82.
52. Tompkins LM, Sit TL, Wallace AD. Unique transcription start sites and distinct promoter regions differentiate the pregnane X receptor (PXR) isoforms PXR 1 and PXR 2. *Drug Metab Dispos*. 2008 May;36(5):923-9.
53. Orans J, Teotico DG, Redinbo MR. The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: recent insights and new challenges. *Mol Endocrinol*. [Review]. 2005 Dec;19(12):2891-900.
54. Frank C, Makkonen H, Dunlop TW, Matilainen M, Vaisanen S, Carlberg C. Identification of pregnane X receptor binding sites in the regulatory regions of genes involved in bile acid homeostasis. *J Mol Biol*. 2005 Feb 18;346(2):505-19.
55. LeCluyse EL. Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chem Biol Interact*. 2001 May 16;134(3):283-9.
56. Timsit YE, Negishi M. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids*. [Review]. 2007 Mar;72(3):231-46.
57. Li T, Chiang JY. Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Jan;288(1):G74-84.

58. Ekins S, Kortagere S, Iyer M, Reschly EJ, Lill MA, Redinbo MR, et al. Challenges predicting ligand-receptor interactions of promiscuous proteins: the nuclear receptor PXR. *PLoS Comput Biol*. 2009 Dec;5(12):e1000594.
59. Xiao L, Nickbarg E, Wang W, Thomas A, Ziebell M, Prorise WW, et al. Evaluation of in vitro PXR-based assays and in silico modeling approaches for understanding the binding of a structurally diverse set of drugs to PXR. *Biochem Pharmacol*. 2011 Mar 1;81(5):669-79.
60. Bistolas N, Wollenberger U, Jung C, Scheller FW. Cytochrome P450 biosensors-a review. *Biosens Bioelectron*. [Review]. 2005 Jun 15;20(12):2408-23.
61. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450. *Toxicol Sci*. [Review]. 2011 Mar;120(1):1-13.
62. Urlacher VB, Girhard M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol*. 2012 Jan;30(1):26-36.
63. Tijet N, Helvig C, Feyereisen R. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*. 2001 Jan 10;262(1-2):189-98.
64. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. [Review]. 2002 Oct 12;360(9340):1155-62.
65. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*. [Review]. 2000;1(6):REVIEWS3003.
66. Pilgrim JL, Gerostamoulos D, Drummer OH. Review: Pharmacogenetic aspects of the effect of cytochrome P450 polymorphisms on serotonergic drug metabolism, response, interactions, and adverse effects. *Forensic Sci Med Pathol*. [Review]. 2011 Jun;7(2):162-84.
67. Wang JF, Chou KC. Molecular modeling of cytochrome P450 and drug metabolism. *Curr Drug Metab*. [Review]. 2010 May;11(4):342-6.
68. Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. [Review]. 2004 Sep 15;199(3):193-209.
69. Hodgson E. In vitro human phase I metabolism of xenobiotics I: pesticides and related chemicals used in agriculture and public health, September 2001. *J Biochem Mol Toxicol*. 2001;15(6):296-9.

70. Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*. [Review]. 2001 May;58(5-6):737-47.
71. Oliveira EJ, Watson DG. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Biomed Chromatogr*. [Review]. 2000 Oct;14(6):351-72.
72. Hodgson E, Rose RL. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacol Ther*. [Review]. 2007 Feb;113(2):420-8.
73. Fretland AJ, Omiecinski CJ. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem Biol Interact*. [Review]. 2000 Dec 1;129(1-2):41-59.
74. Blake BL, Philpot RM, Levi PE, Hodgson E. Xenobiotic biotransforming enzymes in the central nervous system: an isoform of flavin-containing monooxygenase (FMO4) is expressed in rabbit brain. *Chem Biol Interact*. 1996 Jan 5;99(1-3):253-61.
75. Rosenfeld JM, Vargas R, Jr., Xie W, Evans RM. Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. *Mol Endocrinol*. 2003 Jul;17(7):1268-82.
76. Zhou J, Zhang J, Xie W. Xenobiotic nuclear receptor-mediated regulation of UDP-glucuronosyl-transferases. *Curr Drug Metab*. [Review]. 2005 Aug;6(4):289-98.
77. Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutr Metab (Lond)*. 2008;5:27.
78. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. [Review]. 1999;39:1-17.
79. Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA. Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. [Review]. 2002;42:1-23.
80. Kalra BS. Cytochrome P450 enzyme isoforms and their therapeutic implications: an update. *Indian Journal of Medical Sciences*. [Review]. 2007 Feb;61(2):102-16.
81. Moore JT, Kliewer SA. Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions. *Toxicology*. [Review]. 2000 Nov 16;153(1-3):1-10.
82. Mukherjee PK, Ponnusankar S, Pandit S, Hazam PK, Ahmmed M, Mukherjee K. Botanicals as medicinal food and their effects on drug metabolizing enzymes.

Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. [Review]. 2011 Dec;49(12):3142-53.

83. Izzo AA. Interactions between Herbs and Conventional Drugs: Overview of the Clinical Data. Medical principles and practice. 2012 Jan 11.

84. Ruhl R. Induction of PXR-mediated metabolism by beta-carotene. Biochimica et Biophysica Acta. [Review]. 2005 May 30;1740(2):162-9.

85. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. Endocr Rev. [Review]. 2002 Oct;23(5):687-702.

86. Lin JH. CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications. Pharm Res. [Review]. 2006 Jun;23(6):1089-116.

87. Tari L, Anwar S, Liang S, Cai J, Baral C. Discovering drug-drug interactions: a text-mining and reasoning approach based on properties of drug metabolism. Bioinformatics. 2010 Sep 15;26(18):i547-53.

88. Willson TM, Kliewer SA. PXR, CAR and drug metabolism. Nat Rev Drug Discov. [Review]. 2002 Apr;1(4):259-66.

89. Baldauf C, Kubo R, Silva F, Irgang B. " Ferveu, queimou o ser da erva": knowledge of local experts on medicinal plants in Southern Brazil. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2009;11(3):282-91.

90. Verdam MCS, Silva CB. O estudo de plantas medicinais e a correta identificação botânica. Visão Acadêmica. 2010;11(1):7-13.

91. WHO. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva: World Health Organization. 2002.

92. Pasa MC. Saber local e medicina popular: a etnobotânica em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Humanas. 2011;6(1):179-96.

93. Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêuta. Texto & Contexto - Enfermagem. 2006;15:115-21.

94. Veiga Jr VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura. Química nova. 2005;28(3):519-28.

95. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília: Diário Oficial da União; 2006.
96. Brasil. Presidência da República. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e dá outras providências. In: União DOd, editor. Brasília: Diário Oficial da União; 2006.
97. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 10, de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União; 2010.
98. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 886, de 22 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde. Brasília: Diário Oficial da União; 2010.
99. Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007;17:444-7.
100. Losqui YR, Rozete FSS, Almeida MB, Bittencourt AHC, Pereira SPF. Activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae on culture of retinal ganglion cells in vitro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009;19(4):931-6.
101. Varanda EA, Varella SD, Rampazo RA, Kitagawa RR, Raddi MS, Vilegas W, et al. Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: a naphthopyranone dimer isolated from *Paepalanthus planifolius*. *Toxicology in vitro*. 2006 Aug;20(5):664-8.
102. Chang JM, Hwang SJ, Kuo HT, Tsai JC, Guh JY, Chen HC, et al. Fatal outcome after ingestion of star fruit (*Averrhoa carambola*) in uremic patients. *Am J Kidney Dis*. [Case Reports]. 2000 Feb;35(2):189-93.
103. Neto MM, Silva GEB, Costa RS, Vieira Neto OM, Garcia-Cairasco N, Lopes NP, et al. Star fruit: simultaneous neurotoxic and nephrotoxic effects in people with previously normal renal function. *NDT Plus*. 2009 December 1, 2009;2(6):485-8.
104. Samuels N, Finkelstein Y, Singer SR, Oberbaum M. Herbal medicine and epilepsy: proconvulsive effects and interactions with antiepileptic drugs. *Epilepsia*. 2008 Mar;49(3):373-80.
105. Bista D, Palaian S, Shankar PR, Prabhu MM, Paudel R, Mishra P. Understanding the essentials of drug interactions: a potential need for safe and effective use of drugs. *Kathmandu University medical journal*. [Review]. 2007 Jul-Sep;5(3):421-30.

106. Henderson L, Yue QY, Bergquist C, Gerden B, Arlett P. St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*. [Review]. 2002 Oct;54(4):349-56.
107. Jiang X, Williams KM, Liauw WS, Ammit AJ, Roufogalis BD, Duke CC, et al. Effect of St John's wort and ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2004 May;57(5):592-9.
108. Makela S, Davis VL, Tally WC, Korkman J, Salo L, Vihko R, et al. Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast Cancer Cells. *Environmental Health Perspectives*. 1994 Jun;102(6-7):572-8.
109. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 2000 Oct;141(10):3657-67.
110. Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gursipide E. In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1993 May;45(5):399-405.
111. Harris DM, Besselink E, Henning SM, Go VL, Heber D. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha- or Beta-mediated responses in transfected breast cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2005 Sep;230(8):558-68.
112. Usui T, Ikeda Y, Tagami T, Matsuda K, Moriyama K, Yamada K, et al. The phytochemical lindleyin, isolated from *Rhei rhizoma*, mediates hormonal effects through estrogen receptors. *The Journal of endocrinology*. 2002 Nov;175(2):289-96.
113. Basly JP, Marre-Fournier F, Le Bail JC, Habrioux G, Chulia AJ. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sciences*. 2000 Jan 21;66(9):769-77.
114. Das DK, Mukherjee S, Ray D. Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity. *Heart failure reviews*. 2010 Sep;15(5):467-77.
115. Gehm BD, McAndrews JM, Chien Sep;72(9):1603-7. PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Dec 9;94(25):14138-43.
116. Zierau O, Hamann J, Tischer S, Schwab P, Metz P, Vollmer G, et al. Naringenin-type flavonoids show different estrogenic effects in mammalian and

teleost test systems. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005 Jan 28;326(4):909-16.

117. Djiogue S, Halabalaki M, Alexi X, Njamen D, Fomum ZT, Alexis MN, et al. Isoflavonoids from *Erythrina poeppigiana*: evaluation of their binding affinity for the estrogen receptor. *Journal of Natural Products*. 2009

118. Deng R. Therapeutic effects of guggul and its constituent guggulsterone: cardiovascular benefits. *Cardiovascular drug reviews*. [Review]. 2007 Winter;25(4):375-90.

119. Burris TP, Montrose C, Houck KA, Osborne HE, Bocchinfuso WP, Yaden BC, et al. The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand. *Molecular Pharmacology*. 2005 Mar;67(3):948-54.

120. Lee YJ, Chung E, Lee KY, Lee YH, Huh B, Lee SK. Ginsenoside-Rg1, one of the major active molecules from *Panax ginseng*, is a functional ligand of glucocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1997 Oct 20;133(2):135-40.

121. Wu J, Pan Z, Wang Z, Zhu W, Shen Y, Cui R, et al. Ginsenoside Rg1 protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal apoptosis via estrogen receptor alpha and glucocorticoid receptor-dependent anti-protein nitration pathway. *Neuropharmacology*. 2012 Epub Date 2012/04/27.

122. Jaradat MS, Noonan DJ, Wu B, Avery MA, Feller DR. Pseudolaric acid analogs as a new class of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Planta Medica*. 2002 Aug;68(8):667-71.

123. Huang TH, Kota BP, Razmovski V, Roufogalis BD. Herbal or natural medicines as modulators of peroxisome proliferator-activated receptors and related nuclear receptors for therapy of metabolic syndrome. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. [Review]. 2005 Jan;96(1):3-14.

124. Takahashi N, Kawada T, Goto T, Yamamoto T, Taimatsu A, Matsui N, et al. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPARgamma and PPARalpha in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. *FEBS Letters*. 2002 Mar 13;514(2-3):315-22.

125. Hwang BY, Lee JH, Nam JB, Kim HS, Hong YS, Lee JJ. Two new furanoditerpenes from *Saururus chinensis* and their effects on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal of Natural Products*. 2002 Apr;65(4):616-7.

126. Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Letters*. 2001 May 4;496(1):12-8.
127. Yoon M, Lee H, Jeong S, Kim JJ, Nicol CJ, Nam KW, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is involved in the regulation of lipid metabolism by ginseng. *British Journal of Pharmacology*. 2003 Apr;138(7):1295-302.
128. Mizuno CS, Ma G, Khan S, Patny A, Avery MA, Rimando AM. Design, synthesis, biological evaluation and docking studies of pterostilbene analogs inside PPARalpha. *Bioorganic and Medicinal Chemistr*. 2008 Apr 1;16(7):3800-8.
129. Brobst DE, Ding X, Creech KL, Goodwin B, Kelley B, Staudinger JL. Guggulsterone activates multiple nuclear receptors and induces CYP3A gene expression through the pregnane X receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2004 Aug;310(2):528-35.
130. Dong H, Lin W, Wu J, Chen T. Flavonoids activate pregnane x receptor-mediated CYP3A4 gene expression by inhibiting cyclin-dependent kinases in HepG2 liver carcinoma cells. *BMC Biochem*. 2010;11:23.
131. Nahrstedt A, Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. [Review]. 1997 Sep;30 Suppl 2:129-34.
132. Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in vitro*. [Review]. 2006 Mar;20(2):187-210.
133. Bailey DG, Malcolm J, Arnold O, Spence JD. Grapefruit juice-drug interactions. *British Journal of Clinical Pharmacology*. [Review]. 1998 Aug;46(2):101-10.
134. Erdelmeier CA. Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. 1998 Jun;31 Suppl 1:2-6.
135. Carvalho AC, Silveira D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. *Brasília médica*. 2010;48(2):219-37.
136. Jiang B, Cai F, Gao S, Meng L, Liang F, Dai X, et al. Induction of cytochrome P450 3A by Shexiang Baoxin Pill and its main components. *Chemico-Biological Interactions*. 2012 Jan 25;195(2):105-13.

137. Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001 Jun;49(6):3106-12.
138. Liu L, Shan S, Zhang K, Ning ZQ, Lu XP, Cheng YY. Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytother Res*. . 2008 Oct;22(10):1400-3.
139. Conde R, Correa VS, Carmona F, Contini SH, Pereira AM. Chemical composition and therapeutic effects of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. *Phytomedicine*. [Clinical Trial, Phase II]. 2011 Nov 15;18(14):1197-201.
140. Mae T, Kishida H, Nishiyama T, Tsukagawa M, Konishi E, Kuroda M, et al. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand-binding activity affects diabetes in KK-Ay mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of nutrition*. 2003 Nov;133(11):3369-77.
141. Olivero-Verbel J, Guerrero-Castilla A, Stashenko E. Toxicidad del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown quimiotipo citral. *Acta toxicológica argentina*. 2010;18(1):21-7.
142. Sato M, Tai T, Nunoura Y, Yajima Y, Kawashima S, Tanaka K. Dehydrotrametenolic acid induces preadipocyte differentiation and sensitizes animal models of noninsulin-dependent diabetes mellitus to insulin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2002 Jan;25(1):81-6.
143. Wilkinson AS, Monteith GR, Shaw PN, Lin CN, Gidley MJ, Roberts-Thomson SJ. Effects of the mango components mangiferin and quercetin and the putative mangiferin metabolite norathyriol on the transactivation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008 May 14;56(9):3037-42.
144. Jiang N, Xin W, Wang T, Zhang L, Fan H, Du Y, et al. Protective effect of aescin from the seeds of *Aesculus hippocastanum* on liver injury induced by endotoxin in mice. *Phytomedicine*. 2011 Nov 15;18(14):1276-84.
145. Sirtori CR. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological research* [Review]. 2001 Sep;44(3):183-93.
146. Innocenti G, Vegeto E, Dall'Acqua S, Ciana P, Giorgetti M, Agradi E, et al. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. *Phytomedicine*. 2007 Feb;14(2-3):147-52.

147. Locklear TD, Huang Y, Frasor J, Doyle BJ, Perez A, Gomez-Laurito J, et al. Estrogenic and progestagenic effects of extracts of *Justicia pectoralis* Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of menopause and PMS. *Maturitas*. 2010 Jul;66(3):315-22.
148. Hsu C, Hsieh CL, Kuo YH, Huang CJ. Isolation and identification of cucurbitane-type triterpenoids with partial agonist/antagonist potential for estrogen receptors from *Momordica charantia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011 May 11;59(9):4553-61.
149. Ding X, Staudinger JL. Induction of drug metabolism by forskolin: the role of the pregnane X receptor and the protein kinase a signal transduction pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005 Feb;312(2):849-56.
150. Dowless MS, Barbee JL, Borchert KM, Bocchinfuso WP, Houck KA. Cyclic AMP-independent activation of CYP3A4 gene expression by forskolin. *European Journal of Pharmacology*. 2005 Apr 4;512(1):9-13.
151. Modarai M, Suter A, Kortenkamp A, Heinrich M. The interaction potential of herbal medicinal products: a luminescence-based screening platform assessing effects on cytochrome P450 and its use with devil's claw (*Harpagophyti radix*) preparations. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2011 Mar;63(3):429-38.
152. Unger M, Frank A. Simultaneous determination of the inhibitory potency of herbal extracts on the activity of six major cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography/mass spectrometry and automated online extraction. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2004;18(19):2273-81.
153. Sparreboom A, Cox MC, Acharya MR, Figg WD. Herbal remedies in the United States: potential adverse interactions with anticancer agents. *Journal of clinical oncology*. [Review]. 2004 Jun 15;22(12):2489-503.
154. Freeman BD, Zehnbaauer BA, McGrath S, Borecki I, Buchman TG. Cytochrome P450 polymorphisms are associated with reduced warfarin dose. *Surgery*. 2000 Aug;128(2):281-5.
155. Budzinski JW, Foster BC, Vandenhoeck S, Arnason JT. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2000 Jul;7(4):273-82.
156. Pal D, Mitra AK. MDR- and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions. *Life Sciences*. [Review]. 2006 Mar 27;78(18):2131-45.

157. Quilez AM, Saenz MT, Garcia MD. *Uncaria tomentosa* (Willd. ex. Roem. & Schult.) DC. and *Eucalyptus globulus* Labill. interactions when administered with diazepam. *Phytotherapy research*. 2012 Mar;26(3):458-61.
158. Saw JT, Bahari MB, Ang HH, Lim YH. Potential drug-herb interaction with antiplatelet/anticoagulant drugs. *Complementary therapies in clinical practice*. 2006 Nov;12(4):236-41.
159. Klein T, Longhini R, Bruschi ML, Mello JCP. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2010;30(3):241-8.
160. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga V, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*. 2002;25(3):429-38.
161. Hellum BH, Hu Z, Nilsen OG. The induction of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by six trade herbal products in cultured primary human hepatocytes. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2007 Jan;100(1):23-30.
162. Morihara N, Ide N, Weiss N. Aged garlic extract inhibits CD36 expression in human macrophages via modulation of the PPARgamma pathway. *Phytother Res*. 2010 Apr;24(4):602-8.
163. Zou L, Harkey MR, Henderson GL. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sciences*. 2002 Aug 16;71(13):1579-89.
164. Suo M, Isao H, Ishida Y, Shimano Y, Bi C, Kato H, et al. Phenolic lipid ingredients from cashew nuts. *Journal of natural medicines*. 2012 Jan;66(1):133-9.
165. Sheng X, Zhang Y, Gong Z, Huang C, Zang YQ. Improved Insulin Resistance and Lipid Metabolism by Cinnamon Extract through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *PPAR research* [serial on the Internet]. 2008 2602825]; 2008.
166. Cho KW, Kim YO, Andrade JE, Burgess JR, Kim YC. Dietary naringenin increases hepatic peroxisome proliferators-activated receptor alpha protein expression and decreases plasma triglyceride and adiposity in rats. *European Journal of Nutrition*. 2011 Mar;50(2):81-8.
167. Lee YK, Lee WS, Hwang JT, Kwon DY, Surh YJ, Park OJ. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPKalpha-PPAR-gamma in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPKalpha-COX-2 in cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009 Jan 14;57(1):305-10.

168. Nishiyama T, Mae T, Kishida H, Tsukagawa M, Mimaki Y, Kuroda M, et al. Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) suppress an increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005 Feb 23;53(4):959-63.
169. Zhang W, Lim LY. Effects of spice constituents on P-glycoprotein-mediated transport and CYP3A4-mediated metabolism in vitro. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2008 Jul;36(7):1283-90.
170. Foster BC, Vandenhoeck S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, et al. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2003 May;10(4):334-42.
171. Appiah-Opong R, Commandeur JN, van Vugt-Lussenburg B, Vermeulen NP. Inhibition of human recombinant cytochrome P450s by curcumin and curcumin decomposition products. *Toxicology*. 2007 Jun 3;235(1-2):83-91.
172. De-Oliveira AC, Ribeiro-Pinto LF, Paumgarten JR. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicology Letters*. 1997 Jun 16;92(1):39-46.
173. Kuroda M, Mimaki Y, Honda S, Tanaka H, Yokota S, Mae T. Phenolics from *Glycyrrhiza glabra* roots and their PPAR-gamma ligand-binding activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2010 Jan 15;18(2):962-70.
174. Mueller M, Jungbauer A. Culinary plants, herbs and spices—A rich source of PPAR γ ligands. *Food Chemistry*. 2009;117(4):660-7.
175. Honda K, Kamisoyama H, Tominaga Y, Yokota S, Hasegawa S. The molecular mechanism underlying the reduction in abdominal fat accumulation by licorice flavonoid oil in high fat diet-induced obese rats. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*. 2009 Oct;80(5):562-9.
176. Piersen CE. Phytoestrogens in botanical dietary supplements: implications for cancer. *Integrative cancer therapies*. [Review]. 2003 Jun;2(2):120-38.
177. Usia T, Iwata H, Hiratsuka A, Watabe T, Kadota S, Tezuka Y. CYP3A4 and CYP2D6 inhibitory activities of Indonesian medicinal plants. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2006 Jan;13(1-2):67-73.
178. Pandit S, Ponnusankar S, Bandyopadhyay A, Ota S, Mukherjee PK. Exploring the possible metabolism mediated interaction of *Glycyrrhiza glabra* extract with CYP3A4 and CYP2D6. *Phyther Res*. 2011 Oct;25(10):1429-34.

179. Ganzera M, Schneider P, Stuppner H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sciences*. 2006 Jan 18;78(8):856-61.
180. Chung MJ, Cho SY, Bhuiyan MJ, Kim KH, Lee SJ. Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *British journal of nutrition*. 2010 Jul;104(2):180-8.
181. Shih CC, Lin CH, Lin WL, Wu JB. *Momordica charantia* extract on insulin resistance and the skeletal muscle GLUT4 protein in fructose-fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009 May 4;123(1):82-90.
182. Sasa M, Inoue I, Shinoda Y, Takahashi S, Seo M, Komoda T, et al. Activating effect of momordin, extract of bitter melon (*Momordica Charantia* L.), on the promoter of human PPARdelta. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2009;16(6):888-92.
183. Appiah-Opong R, Commandeur JN, Axson C, Vermeulen NP. Interactions between cytochromes P450, glutathione S-transferases and Ghanaian medicinal plants. *Food and chemical toxicology*. 2008 Dec;46(12):3598-603.
184. Yu B, Cook C, Santanam N. The aporphine alkaloid boldine induces adiponectin expression and regulation in 3T3-L1 cells. *Journal of Medicinal Food*. 2009 Oct;12(5):1074-83.
185. Doyle BJ, Frasor J, Bellows LE, Locklear TD, Perez A, Gomez-Laurito J, et al. Estrogenic effects of herbal medicines from Costa Rica used for the management of menopausal symptoms. *Menopause*. 2009 Jul-Aug;16(4):748-55.
186. Debersac P, Heydel JM, Amiot MJ, Goudonnet H, Artur Y, Suschetet M, et al. Induction of cytochrome P450 and/or detoxication enzymes by various extracts of rosemary: description of specific patterns. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2001 Sep;39(9):907-18.
187. Christensen KB, Jorgensen M, Kotowska D, Petersen RK, Kristiansen K, Christensen LP. Activation of the nuclear receptor PPARgamma by metabolites isolated from sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2010 Oct 28;132(1):127-33.
188. Lima CF, Valentao PC, Andrade PB, Seabra RM, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*. 2007 Apr 25;167(2):107-15.

189. Christensen KB, Minet A, Svenstrup H, Grevsen K, Zhang H, Schrader E, et al. Identification of plant extracts with potential antidiabetic properties: effect on human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), adipocyte differentiation and insulin-stimulated glucose uptake. *Phytotherapy research*. 2009 Sep;23(9):1316-25.
190. Maliakal PP, Wanwimolruk S. Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2001 Oct;53(10):1323-9.
191. Salazar EL, Jayme V. Depletion of specific binding sites for estrogen receptor by *Uncaria tomentosa*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 1998;41:123-4.
192. Kim IG, Kang SC, Kim KC, Choung ES, Zee OP. Screening of estrogenic and antiestrogenic activities from medicinal plants. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2008 Jan;25(1):75-82.
193. Kang SC, Lee CM, Choi H, Lee JH, Oh JS, Kwak JH, et al. Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. *Phytother Res*. 2006 Nov;20(11):1017-9.
194. Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RC, Scanlan TS. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem Biol*. 1998 Jun;5(6):299-306.
195. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
196. Van Leeuwen W, Hagendoorn MJM, Ruttink T, Van Poecke R, Van Der Plas LHW, Van Der Krol AR. The use of the luciferase reporter system for in planta gene expression studies. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2000;18(2):143-4.
197. Freshney I. Application of cell cultures to toxicology. *Cell Biol Toxicol*. [Review]. 2001;17(4-5):213-30.
198. Contag CH, Spilman SD, Contag PR, Oshiro M, Eames B, Dennery P, et al. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol*. 1997 Oct;66(4):523-31.
199. New DC, Miller-Martini DM, Wong YH. Reporter gene assays and their applications to bioassays of natural products. *Phytother Res*. [Review]. 2003 May;17(5):439-48.

200. Song X, Xie M, Zhang H, Li Y, Sachdeva K, Yan B. The pregnane X receptor binds to response elements in a genomic context-dependent manner, and PXR activator rifampicin selectively alters the binding among target genes. *Drug Metab Dispos.* 2004 Jan;32(1):35-42.
201. Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, et al. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2002 Jul;30(7):795-804.
202. Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, et al. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7500-2.
203. Liu L, Li YF, Cheng YY. A method for the production and characterization of fractionated libraries from Chinese herbal formulas. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008 Feb 1;862(1-2):196-204.
204. Vendruscolo GS, Rates SMK, Mentz LA. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev Bras Farmacogn.* 2005;15(4):361-72.
205. Mota JH, Vieira MdC, Araújo Cd. Crescimento e produção de alface e marcela em cultivo solteiro e consorciado. *Acta Scientiarum Agronomy.* 2011;33:269-73.
206. Fachinetto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACFd, Tedesco SB. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. 2007.
207. Bettega JM, Teixeira H, Bassani VL, Barardi CR, Simoes CM. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytother Res.* 2004 Oct;18(10):819-23.
208. Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Minihane AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr.* [Review]. 2008 Jan;99(1):12-22.