

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

RÁIZA YANELLI ALVES DA SILVA

ESTUDO DOS EFEITOS DE ESPÉCIES VEGETAIS DA RELAÇÃO NACIONAL
DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS SOBRE O RECEPTOR PXR

BRASÍLIA
2019

RÁIZA YANELLI ALVES DA SILVA

ESTUDO DOS EFEITOS DE ESPÉCIES VEGETAIS DA RELAÇÃO NACIONAL
DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS SOBRE O RECEPTOR PXR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha
Neves

Coorientadora: Dra. Mariella Guimarães Lacerda

BRASÍLIA

2019

RÁIZA YANELLI ALVES DA SILVA

ESTUDO DOS EFEITOS DE ESPÉCIES VEGETAIS DA RELAÇÃO NACIONAL
DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS SOBRE O RECEPTOR PXR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 15/08/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves (Presidente)

Universidade de Brasília

Dra. Cinthia Gabriel Meireles

Ministério da Saúde

Dra. Laíza Magalhães de Araújo

Fundação Hemocentro de Brasília

Profa. Dra. Flora Aparecida Milton (Suplente)

Universidade de Brasília

Aos meus pais Waldivino e Sebastiana,
por nunca terem poupado esforços para minha
formação educacional e por todo incentivo.

Ao meu grande amor, Marcus, pelo
carinho, paciência e companheirismo durante
essa jornada.

Ao meu irmão Waltinele e sua família,
por sempre estarem do meu lado e por todo
amor.

E a minha amiga Sarah Caroline (*in
memoriam*) que com sua pureza me ensinou a
ser uma pessoa melhor.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, força e coragem para superar as dificuldades, à Universidade de Brasília-UnB, professores, administração e direção que abriram essa oportunidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Neves pelo suporte e incentivo todas as vezes que precisei, na elaboração deste trabalho.

À minha coorientadora Dra. Mariella, que a cada dia da minha trajetória no Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol) transmitiu seu conhecimento da melhor forma possível.

Aos meus pais Waldivino e Sebastiana, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu irmão e sobrinhos, que nos momentos de ausência dedicados aos estudos, sempre entenderam que o futuro é feito a partir da dedicação.

Aos meus sogros Maria Alvina e Francisco por me acolherem, como uma filha, em seu lar, durante o tempo do mestrado, e incentivo diário para investir em minha qualificação profissional.

Às minhas mais que amigas Kelly e Amanda, por sempre estarem do meu lado em todos momentos.

Aos amigos do FarMol que fizeram parte da minha formação acadêmica e que levarei sempre em meu coração.

A todos que direta ou indiretamente me fizeram companhia nesta caminhada, o meu muito obrigada!

“Para fazer as coisas bem, é necessário: primeiro o amor, depois a técnica”
(Antoni Gaudí)

RESUMO

SILVA, Ráiza Yanelli Alves. **Estudo dos efeitos de espécies vegetais da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS sobre o receptor PXR**. Brasília, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

O uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos vem crescendo em todo o mundo e na mesma tendência o governo brasileiro criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) para implementar o uso de fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Porém, o uso de fitoterápicos não é isento de problemas e vários estudos demonstraram que a coadministração de plantas medicinais e medicamentos alopáticos está associado a maior risco de interações farmacocinéticas por aumento ou diminuição na expressão das enzimas CYP3A4. O receptor nuclear pregnano X (PXR), regula a expressão de diversos genes ligados ao metabolismo, como por exemplo o da CYP3A4. Considerando a possibilidade de interação medicamentosa mediada por PXR, induzida por plantas medicinais, o objetivo desse estudo foi de avaliar os efeitos de cinco extratos vegetais com potencial medicinal, *Bidens pilosa* L., *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz, *Matricaria chamomilla*, *Morus nigra* L. e *Tagetes minuta*, sobre a atividade transcricional regulada pelo receptor humano de pregnano X (hPXR). Em ensaios de transfecção transiente e gene repórter realizados em células HeLa co-transfectadas com os vetores de expressão, um contendo o domínio de ligação de hPXR, e o outro, o plasmídeo repórter com o elemento responsivo do GAL4 fusionado ao gene da luciferase demonstrou que o extrato aquoso de *Bryophyllum pinnatum* elevou a atividade transcricional do hPXR nas concentrações 0,5 e 1,0 mg / mL em 7,2 e 19,3 vezes, respectivamente. Em contrapartida, os extratos aquosos de *Bidens pilosa*, *Matricaria chamomilla*, *Morus nigra* e *Tagetes minuta* não demonstraram qualquer efeito sobre a atividade transcricional do receptor pregnano X. Esses resultados demonstram que o extrato aquoso de *Bryophyllum pinnatum*, ao ativar hPXR pode induzir aumento da expressão de CYP3A4 e favorecer o aparecimento de interação medicamentosa. Novos estudos são necessários para avaliar se o extrato aquoso de *Bryophyllum pinnatu* modifica a expressão e atividade de CYP3A4 em hepatócitos favorecendo a interação medicamentosa.

Palavras-chave: agonismo, receptor pregnano X, *Bidens pilosa* L., *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz, *Matricaria chamomilla*, *Morus nigra* L. e *Tagetes minuta*

ABSTRACT

SILVA, Ráiza Yanelli Alves. **Study of the effects of plant species on the National Relation of Medicinal Plants of SUS interest on the PXR receptor.** Brasília, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

The use of medicinal plants and phytoterapics has been increasing worldwide and in Brazil, the Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) was created in order to implement the use of phytoterapy in their health care system Sistema Único de Saúde (SUS). However, the use of phytoterapics is not free of medical occurrence and some studies showed that the coadministration of medicinal plants and allopathic preparations are associated to a greater risk of pharmacokinetic interactions by increasing or decreasing the CYP3A4 expression. The pregnane X receptor (PXR) regulates the expression of metabolic genes, including the CYP3A4 gene expression. Considering the possibility of PXR-mediated drug interaction induced by medicinal plants, the goal of this study was to evaluate the effects of 5 plant extracts: *Bidens pilosa* L., *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz, *Matricaria chamomilla*, *Morus nigra* L. and *Tagetes minuta* with known effects over the transcriptional activity regulated by the human pregnane X receptor (hPXR). The transient transfection and gene reporter assays were performed on HeLa cells co-transfected with the hPXR expression vector containing a luciferase gene and it showed that the aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum* increased the hPXR transcriptional activity by 7,2 and 19,3 times in the concentration of 0,5 and 1,0 mg/mL respectively. On the other hand, the aqueous extract of *Bidens pilosa*, *Matricaria chamomilla*, *Morus nigra* and *Tagetes minuta* did not display any effect over the PXR transcriptional activity. These results indicate that the aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum*, by activating the hPXR, it can induct the up-regulation of CYP3A4 expression and promote the appearance of drug interactions. Future studies should be conducted to check if the aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum* does indeed modify the CYP3A4 expression and activity in hepatocytes, favoring drug interactions.

Keywords: agonism, pregnane X receptor, *Bidens pilosa*, *Matricaria chamomilla*, *Morus nigra* and *Tagetes minuta*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação das estruturas lineares entre um receptor nuclear e PXR.....	23
Figura 2. Mecanismo de ação do PXR.	24
Figura 3. Interações medicamentosas mediadas por PXR.....	27
Figura 4. Ensaio de viabilidade celular com MTT.	46
Figura 5. O extrato de <i>Morus nigra</i> não alterou a atividade transcricional do receptor nuclear hPXR.	47
Figura 6. O extrato aquoso de <i>Morus nigra</i> não exerceu efeito antagonista sobre o hPXR. ..	48
Figura 7. O extrato aquoso de <i>Morus nigra</i> não mostrou efeito sobre o CMV-LUC.	49
Figura 8. O extrato de <i>Bidens pilosa</i> não alterou a atividade transcricional do receptor nuclear hPXR.	50
Figura 9. O extrato aquoso de <i>Bidens pilosa</i> não exerceu efeito antagonista sobre o hPXR..	51
Figura 10. O extrato aquoso de <i>Bidens pilosa</i> não demonstrou efeito sobre o promotor CMV-LUC.	52
Figura 11. O extrato de <i>Tagetes minuta</i> não alterou a atividade transcricional do receptor nuclear hPXR.....	53
Figura 12. O extrato aquoso de <i>Tagetes minuta</i> não exerceu efeito antagonista sobre o hPXR.	54
Figura 13. O extrato aquoso de <i>Tagetes minuta</i> não demonstrou efeito sobre o promotor CMV-LUC.	55
Figura 14. O extrato de <i>Matricaria chamomilla</i> não alterou a atividade transcricional do receptor nuclear hPXR.....	56
Figura 15. O extrato aquoso de <i>Matricaria chamomilla</i> não exerceu efeito antagonista sobre o hPXR.	57
Figura 16. O extrato aquoso de <i>Bryophyllum pinnatum</i> é agonista de hPXR.	58
Figura 17. O extrato aquoso de <i>Bryophyllum pinnatum</i> não alterou a atividade transcricional do hTR β	59
Figura 18. O extrato aquoso de <i>Bryophyllum pinnatum</i> não demonstrou efeito sobre o promotor CMV-LUC.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ligantes agonistas do receptor PXR e suas recomendações de uso.	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Família de proteínas do cassete de ligação de ATP
ABCB1	Membro 1 da subfamília B de cassetes de ligação de ATP
AF-1	Função de ativação 1
AF-2	Função de ativação 2
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	Aminotransferase glutâmico pirúvica
AST	Aminotransferase glutâmico oxalacética
BZM	Bortezomibe
CYP3A	Membro 3 da família do citocromo P450
CYPs	Citocromo P450
DBD	Domínio central de ligação ao DNA
LBD	Domínio de ligação ao ligante
DMEM	Meio Dulbecco MEM
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGCG	Epigallocatequina galato
ER	Receptor de estrogênio
GST	Glutathione S-transferase
GR	Receptor de glicocorticóide
HAT	Histonas acetiltransferases
HDAC's	Histonas desacetilases
LB	Lúria Bertani
LDH	Lactato desidrogenase
MDR1	Proteína 1 de resistência a múltiplas drogas
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazólio
NCoR1	Correpressor 1 de receptor nuclear
NcoR2	Correpressor 2 de receptor nuclear
NR1I2	Subfamília do receptor nuclear 1, grupo I, membro 2
PGC-1 α	Coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa
P-gp	Glicoproteína P

PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PXR	Receptor pregnano X
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RNs	Receptores nucleares
RXR α	Receptor retinoide X alfa
SFB	Soro fetal bovino
SRC-1	Coativador de receptor nuclear 1
SRC-2	Coativador de receptor nuclear 2
SUG1	Supressor para GAL-1
SULT	Sulfotransferase
SUS	Sistema Único de Saúde
SXR	Receptor esteroide e xenobiótico
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
UGT	UDP-glucuronosiltransferase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
	2.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos	17
	2.2. RECEPTORES NUCLEARES.....	20
	2.2.1. Classificação dos Receptores Nucleares	20
	2.2.2. Estrutura	21
	2.3. RECEPTOR PREGNANO X	22
	2.3.1. Estrutura	22
	2.3.2. Estrutura Cristalográfica do LBD do PXR	23
	2.3.3. Mecanismos de Ativação e Repressão	24
	2.4. RECEPTOR PREGNANO X NO METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS.....	25
	2.5. INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA	26
	2.6. ESPÉCIES VEGETAIS	29
	2.6.1. <i>Morus nigra L.</i>	30
	2.6.2. <i>Bidens pilosa L.</i>	32
	2.6.3. <i>Tagetes minuta</i>	33
	2.6.4. <i>Bryophyllum pinnatum (Lam.) Kurz</i>	34
	2.6.5. <i>Matricaria chamomilla</i>	36
3.	JUSTIFICATIVA	37
4.	OBJETIVOS	38
	4.1. Geral.....	38
	4.2. Específicos	38
5.	MÉTODOS	39
	5.1. EXTRATOS AQUOSOS.....	39
	5.2. CULTURA DE CÉLULAS	39
	5.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	40
	5.4. TRANSFORMAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO	41

5.5.	ENSAIO DE TRANSFECCÃO TRANSIENTE E GENE REPÓRTER	42
5.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
6.	RESULTADOS	45
6.1.	Avaliação da citotoxicidade dos extratos aquosos.....	45
6.2.	ANÁLISE DO EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSOS NA ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA POR hPXR EM ENSAIOS DE TRANSFECCÃO TRANSIENTE E GENE REPÓRTER.....	47
6.2.1.	O extrato de <i>Morus nigra</i> não demonstrou efeito sobre a atividade transcricional do hPXR.....	47
6.2.2.	O extrato de <i>Bidens pilosa</i> não demonstrou efeito sobre a atividade transcricional do hPXR.....	49
6.2.3.	O extrato de <i>Tagetes minuta</i> não demonstrou efeito sobre a atividade transcricional do hPXR.....	52
6.2.4.	O extrato de <i>Matricaria chamomilla</i> não alterou a atividade transcricional mediada pelo receptor hPXR.....	55
6.2.5.	O extrato aquoso de <i>Bryophyllum pinnatum</i> exerceu atividade agonista sobre o receptor hPXR.....	57
7.	DISCUSSÃO.....	61
8.	CONCLUSÃO.....	65
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas para o tratamento de doenças é tão antigo quanto a própria humanidade (PETROVSKA, 2012). Data de mais de sessenta mil anos. Os primeiros registros foram descobertos em ruínas no Irã (NAGY, [s.d.]).

As drogas vegetais têm sido utilizadas como medicamento em todo o mundo, constituindo importante aspecto de vários sistemas de medicina tradicional, que é a soma de práticas muito antigas que se tipificam como conhecimento técnico nas filosofias e princípios para diferentes culturas, usados para manter a saúde, prevenir e diagnosticar as doenças (WHO, 2002).

No início do século XX, nos países desenvolvidos, a fitoterapia começou a perder espaço para os medicamentos sintéticos, na qualidade de opção terapêutica, enquanto nos países em desenvolvimento a fitoterapia nunca deixou de ser importante e algumas vezes, a única forma de tratamento a que parte da população teve e tem acesso (WHO, 2002). Contudo, segundo a Organização Mundial de Saúde, tem-se observado que atualmente seu uso voltou a crescer e que três quartos da população mundial usam fitoterápicos e outras formas de medicamentos tradicionais (ervas, partes de animais ou minerais) para prevenir e/ou tratar doenças (NIRALI; SHANKAR, 2016).

O Brasil, como detentor de 15 a 20% da biodiversidade mundial, a partir da década de 80 o Estado incentivou pesquisas e programas que objetivam garantir à população o acesso seguro, eficaz e de qualidade ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos (SAÚDE, 2001). Visando garantir à população o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, em 2006 foi elaborada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e suas diretrizes foram especificadas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (REPÚBLICA, 2006; SAÚDE, 2006). Corroborando com o objetivo da PNPMF, o Ministério da Saúde em 2008, implementou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), composta por 71 espécies vegetais utilizadas com fins medicinais nas diversas regiões do território nacional. O objetivo da RENISUS é o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e uso no Sistema Único de Saúde de forma segura e eficaz, contemplando não somente o tratamento, mas também a prevenção de doenças (SAÚDE, 2009).

Além dos efeitos desejáveis das plantas medicinais e fitoterápicos, outros aspectos importantes devem ser considerados, como os efeitos adversos. Existe a crença entre a população em geral, de que plantas medicinais são “produtos naturais” e sem efeitos adversos. Na verdade, as plantas medicinais são uma combinação de compostos potencialmente ativos em concentrações desconhecidas com potencial terapêutico e também com alguns riscos (VENKATARAMANAN; KOMOROSKI; STROM, 2006).

Um exemplo descrito na literatura é a interação entre o *Hypericum perforatum*, conhecido popularmente como erva de São João, que é vastamente utilizada como antidepressivo (GALEOTTI, 2017). Quando administrado juntamente com contraceptivos orais, antivirais ou imunossupressores, pode levar a diminuição do efeito das drogas pelo fato de aumentar a atividade da enzima CYP3A4, pertencente à subfamília do citocromo P450, que metaboliza esses medicamentos. O mecanismo de aumento da atividade da CYP3A4 pelo *Hypericum perforatum* ocorre porque esse fitoterápico tem efeito agonista sobre o receptor pregnano X (PXR) que regula a transcrição da CYP3A4 (MOORE *et al.*, 2000; WATKINS *et al.*, 2003).

O PXR é um receptor nuclear ativado por ligante, altamente expresso no fígado e intestino, exercendo função essencial no sistema metabólico de desintoxicação do organismo ao detectar a presença de xenobióticos, coordenando a expressão de enzimas que metabolizam drogas como as CYPs (MA, X.; CHEN; TIAN, 2015; OLADIMEJI; CHEN, 2018). A ativação do PXR por um agonista pode aumentar o metabolismo de agentes terapêuticos administrados, através da indução dessas enzimas, diminuindo sua eficácia terapêutica (MOORE *et al.*, 2000; SINZ, M. W., 2013). Ao contrário, a inibição do PXR impede a expressão das CYPs e diminui o metabolismo de alguns fármacos, levando ao aumento de suas concentrações plasmáticas que podem atingir níveis tóxicos (MOOIMAN *et al.*, 2013).

Considerando que a ativação ou inibição de PXR pode ter impacto no metabolismo de medicamentos e conseqüentemente na indução de interações medicamentosas, o estudo da ação das espécies vegetais da RENISUS sobre a atividade do PXR pode contribuir para a incorporação segura, eficaz e de qualidade da fitoterapia no SUS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas Medicinais e Fitoterápicos

As plantas medicinais são espécies vegetais que podem ser usadas no momento da colheita para fabricação de drogas vegetais e para desenvolvimento de novas drogas, todas com fins terapêuticos (WHO, 1998).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Autarquia que viabiliza o controle sanitário para promover a proteção da saúde dos cidadãos (REPÚBLICA, 1999), medicamentos fitoterápicos são elaborações preparadas unicamente por matérias primas vegetais, onde sua eficácia e segurança no uso sejam conhecidas através de investigações sobre utilização, publicações científicas e evidências clínicas (ANVISA, 2010b). Existe ainda uma segunda categoria de fitoterápicos, que são os produtos tradicionais fitoterápicos, elaborados como os medicamentos fitoterápicos, mas sua efetividade e segurança são comprovadas pelo uso tradicional de longo histórico de uso seguro e efetivo e por dados da literatura (ANVISA, 2014).

Nas últimas três décadas o uso de fitoterápicos para cuidados com a saúde aumentou consideravelmente. Em média, 80% da população mundial faz uso de um ou mais produtos à base de plantas (EKOR, 2014). Nos Estados Unidos a fitoterapia é a medicina alternativa mais comumente usada e que cresce a cada ano, com uma estimativa de 18,6% dos adultos usuários em 2002 em comparação com 12,1% em 1997 (TINDLE *et al.*, 2005). Na China, os fitoterápicos respondem por 30% a 50% do consumo total de medicamentos (LU; LU, 2014). Em 1991 as vendas de medicamentos fitoterápicos na União Europeia alcançaram a marca de 6 bilhões de dólares e no ano de 1996 chegou a quase 10 bilhões de dólares (KAMBOJ, V. P., 2000).

Mundialmente o consumo de fitoterápicos é tamanho, que é essencial identificar os perigos relativos ao seu consumo. A segurança dos medicamentos fitoterápicos se tornou um problema de saúde pública e a inclusão desses medicamentos em sistemas de farmacovigilância, que é a ciência referente à identificação, avaliação, compreensão e prevenção de efeitos adversos ou problemas associados ao uso de medicamentos, está ficando cada vez mais significativa (WHO, 2004).

Devido a crença de que drogas herbáceas são livres de efeitos indesejáveis, os fitoterápicos possuem grande aceitação pela população e são frequentemente utilizados para uso terapêutico no tratamento de doenças crônicas (DE SMET, 1995). Embora os efeitos adversos causados pelos agentes fitoterápicos em relação aos medicamentos alopáticos sejam menos frequentes, eles existem. Há várias causas que podem causar tais efeitos, como informações insuficientes sobre reações adversas, esquema posológico, período de tempo a ser empregado, e em especial a interação com drogas convencionais (CALIXTO, 2000).

A interação medicamentosa dá-se quando a eficácia farmacológica de uma determinada droga é modificada pela ação de outra droga e pode ocorrer através de vários mecanismos (HUANG *et al.*, 2013).

Um dos mecanismos de interação medicamentosa é via PXR. O PXR regula a transcrição da enzima CYP3A4, responsável pela metabolização de grande parte dos medicamentos (WERK; CASCORBI, 2014). A indução ou bloqueio do PXR pode aumentar ou diminuir a expressão dessa enzima, respectivamente.

O estudo de Teotico e colaboradores (2008) corroborou que a colupulona, composto isolado do *Humulus lupulus* L. (lúpulo), suplemento botânico utilizado por mulheres como coadjuvante do sono e alívio dos sintomas pós-menopausa, é agonista de PXR. Esses resultados sugerem que o cotratamento com lúpulo pode causar diminuição na concentração de outros medicamentos prescritos. A ocorrência desse fato é um problema sério nos tempos da polifarmácia, na qual os pacientes frequentemente usam inúmeros medicamentos (TEOTICO, DENISE G. *et al.*, 2008; WANG, S. *et al.*, 2016).

O estudo de Golden e colaboradores (2008) mostrou um caso de interação causada por outro mecanismo, onde a epigalocatequina galato (EGCG) o principal composto polifenólico presente no chá verde (*Camellia sinensis* L.) antagonizou o efeito do bortezomibe (BZM), um medicamento usado no tratamento de mieloma múltiplo, levando assim a inibição do efeito terapêutico do bortezomibe e de outros inibidores do proteossoma. O BZM age inibindo o proteossoma, que é um complexo de enzimas responsável pela degradação de proteínas marcadas a partir do inventário da célula. Essa degradação é responsável pela regulação da homeostase proteica no interior da célula, aumentando a sobrevivência das células durante condições de baixo estresse, por outro lado, inicia a apoptose em casos de estresse severo, como em resposta à efetiva inibição

da atividade do proteossoma pelo BZM. O EGCG reagiu diretamente com o BZM e bloqueou sua função inibitória de proteossoma, tendo como consequência a não indução da morte das células cancerosas. Os resultados sugerem que o consumo de produtos à base de chá verde podem ser contraindicados durante a terapia do câncer com BZM (ENG; THANIKACHALAM; RAMAMURTHY, 2018; GOLDEN *et al.*, 2009).

Corroborando que o uso de fitoterápicos pode levar um indivíduo a se expor a sérios riscos de saúde, em 1992 foi publicado na revista *The Lancet*, um relato de caso sobre uma mulher de 68 anos com icterícia e fadiga. Anteriormente apresentava boa saúde, não tinha estado em contato com o vírus da hepatite, nem tinha recebido sangue ou hemoderivados, não havia viajado para o exterior nem bebido álcool em excesso. A paciente estava fazendo uso de um medicamento à base de plantas contendo *Teucrium chamaedrys* L., uma planta usada no auxílio da perda de peso. Nos exames de sangue houve alterações séricas da bilirrubina, transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e fosfatase alcalina. Testes sorológicos das hepatites A, B e C, Epstein-Barr vírus, citomegalovírus, vírus herpes simples e testes para anticorpos (anti-núcleo, anti-músculo liso e anticorpos anti-mitochondriais) foram negativos. A ultrassonografia não mostrou nenhuma anormalidade hepática ou biliar. A condição de saúde da paciente piorou levando-a ao coma. O transplante de fígado não foi realizado devido a sua idade e ela veio a óbito. A necropsia revelou necrose hepática maciça. Uma relação causal entre drogas e a hepatite fatal dessa paciente foi sustentada pela exclusão de doenças virais, autoimunes ou biliares. A *Teucrium chamaedrys* L. teve sua venda proibida pelo Departamento Francês de Saúde, depois que 26 casos de hepatite aguda foram notificados aos centros franceses de vigilância de drogas (NENCINI *et al.*, 2014; PERHARIC-WALTON; MURRAY, 1992).

Assim, torna-se essencial a atuação efetiva dos órgãos reguladores e fiscalizadores em relação ao uso de produtos à base de plantas, evitando seu consumo de forma irracional e indiscriminada. Nesse sentido, o governo brasileiro implementou a RENISUS uma lista com 71 plantas medicinais utilizadas como medicinais nas diversas regiões do território nacional, com o objetivo de desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e uso no Sistema Único de Saúde, contemplando não somente o tratamento, mas também a prevenção de doenças (SAÚDE, 2009).

2.2. RECEPTORES NUCLEARES

Receptores nucleares (RN's) são fatores de transcrição intracelulares modulados por ligantes que promovem a regulação da expressão de um gene alvo envolvido nos processos de desenvolvimento, homeostase e metabolismo em um organismo (MATHEW *et al.*, 2018).

São identificados 48 membros em humanos que compõem uma superfamília de RN's cujos ligantes específicos são de natureza lipofílica, como hormônios esteróides, hormônio tireoidiano e ácidos graxos ou ligantes não naturais, tais como drogas tiazolidinadionas. Todos os RN's que tiveram ligantes identificados são alvo de estudos para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de inúmeras doenças, incluindo o câncer, diabetes, aterosclerose, inflamação e distúrbios endócrinos (BURRIS, T. P. *et al.*, 2013; DASH; TYAGI, 2016; LIU; DOWNES; EVANS, 2015).

2.2.1. Classificação dos Receptores Nucleares

De acordo com as características de seus ligantes, os RN's são divididos em 3 grupos. O primeiro grupo é composto por receptores endócrinos que tem afinidade por hormônios lipossolúveis essenciais para a homeostase do sistema endócrino (BIBIANA ORTEGA-DOMÍNGUEZ, 2015).

O segundo grupo de RN's foi primeiramente identificado com base na semelhança da estrutura com receptores endócrinos. Num primeiro momento receberam o nome de órfãos, por não possuírem ligantes, mas com a descoberta de ligantes naturais passaram a ser denominados de órfãos adotados. Essa classe inclui receptores de baixa afinidade para lipídios e xenobióticos e são alvos de drogas promissoras para distúrbios metabólicos, pois regulam a homeostase dos lipídios e/ou glicose, controlando a captação, a síntese, o armazenamento ou a depuração (SONODA; PEI; EVANS, 2008).

O último grupo é composto por genuínos RN's órfãos cujos ligantes (naturais ou sintéticos) ainda não foram identificados. Apesar dos receptores dessa classe poderem ser de difícil manipulação farmacológica, evidências genéticas indicam que alguns deles também estão envolvidos na regulação metabólica e estão sendo amplamente estudados (SONODA *et al.*, 2008).

2.2.2. Estrutura

O isolamento e a caracterização dos receptores de esteróides apontou que eles são compostos de vários domínios e são dotados de funções específicas (ligação ao DNA ou ligação a esteróides). A clonagem do receptor de glicocorticóide - GR viabilizou a primeira hipótese do arranjo genético de um receptor nuclear (EVANS, 1988).

A comparação entre a formação estrutural dos receptores demonstrou uma forte semelhanças e foi definida como seis sub-regiões de A a F, com base no grau de homologia. Cada região desempenha funções exclusivas, podendo interagir entre si (PAWLAK; LEFEBVRE; STAELS, 2012).

A região amino-terminal, região A/B, é altamente variável entre os receptores e, dependendo do receptor, pode dispor de ação de ativação transcricional independente de ligante (função de ativação 1; AF-1) (BURRIS, THOMAS P.; BUSBY; GRIFFIN, 2012).

A região C, domínio central de ligação ao DNA (DBD), tem a função de direcionar os receptores a sequências específicas do DNA conhecidas como elementos responsivos (MANGELSDORF *et al.*, 1995). É constituído por dois dedos de zinco, sendo que três aminoácidos da base do primeiro dedo representam a região chamada de caixa P (P-box). Esses aminoácidos são responsáveis pelo reconhecimento do elemento responsivo específico para cada receptor. A sequência de cinco aminoácidos, localizada entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo é denominada de caixa D (D-box), região de importância para a dimerização do receptor (UMESONO; EVANS, 1989).

A região D, ou dobradiça, que se encontra localizada entre o DBD e o LBD, é uma zona curta e pouco conservada. Exerce uma função na modulação da ligação ao DNA para alguns receptores e também confere flexibilidade à estrutura dos receptores (ZHANG *et al.*, 2015).

A região E, reúne o domínio de ligação ao ligante (LBD), que é encarregada pela ligação ao ligante e possui um bolsão de ligação com sequências de aminoácidos que

determinam a especificidade do ligante e ainda na localidade E, encontra-se o domínio de transativação dependente de ligante (função de ativação 2; AF-2) (ZHI *et al.*, 2016).

2.3. RECEPTOR PREGNANO X

O receptor nuclear Pregnano X (PXR) ou receptor de esteroide e xenobiótico (SXR) (COMMITTEE, 1999), integrante da família de receptores nucleares órfãos adotados, é um fator de transcrição ativado por ligantes que desempenha função crucial na regulação transcricional de genes ligados ao metabolismo de produtos tóxicos derivados de metabólitos endógenos e de substâncias químicas exógenas como os genes que codificam as isoformas das enzimas do citocromo P450 e proteína de resistência a multidroga 1 (MDR1), além de outros genes (DI MASI *et al.*, 2009; GEICK; EICHELBAUM; BURK, 2001).

O PXR é altamente expresso no fígado, intestino delgado e cólon. Tecidos esses em que os genes da CYP3A são mais expressos. Sua ocorrência se dá em outros tecidos como rins, pulmões, cérebro, placenta, pâncreas, glândula mamária, útero, ovário, testículos e próstata, não somente em tecidos normais, mas também em variadas espécies de câncer como o de mama, osteossarcoma, cólon, endométrio, ovário, próstata e esôfago (PAVEK, 2016; QIAO *et al.*, 2013).

2.3.1. Estrutura

Como a maior parte dos RN's, o PXR é composto por um domínio central de ligação ao DNA (DBD), uma dobradiça flexível, região D, que une o DBD ao domínio de ligação ao ligante (LBD) que contém a função de ativação 2 ou AF-2 (ORANS; TEOTICO; REDINBO, 2005).

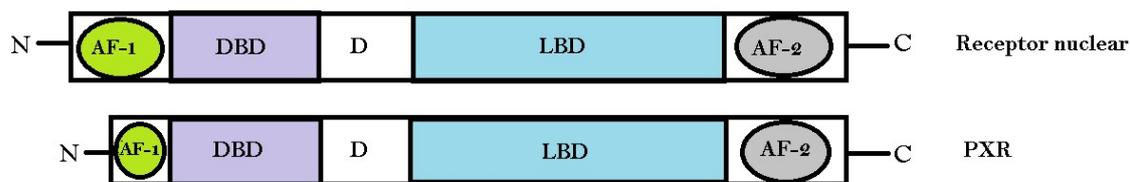


Figura 1. Comparação das estruturas lineares entre um receptor nuclear e PXR. AF-1, função de ativação-1; DBD, domínio de ligação ao DNA; D, dobradiça flexível; LBD, domínio de ligação ao ligante; AF-2, região de ativação dependente de ligante; Adaptado de (QIAO *et al.*, 2013).

Na região N-terminal encontra-se a função de ativação 1 (AF-1) cuja ação é independente de ligante, seguida do domínio de ligação ao DNA (DBD) que é bastante conservado, característica essa dos RN's, responsáveis pela ligação a regiões específicas do DNA, elementos responsivos e dimerização do receptor (CARNAHAN; REDINBO, 2005; LEHMANN *et al.*, 1998).

No domínio de ligação ao ligante (LBD), localiza-se o bolsão de ligação que é altamente flexível, característica essa que lhe permite a associação a uma vasta variedade de ligantes endógenos e exógenos não relacionados estruturalmente e também a estrutura região de ativação dependente de ligante (AF-2) no C-terminal (BUCHMAN; CHAI; CHEN, 2018).

2.3.2. Estrutura Cristalográfica do LBD do PXR

Semelhante a outros RN's, o LBD do receptor pregnano X é organizado em 3 camadas helicoidais sobrepostas, $\alpha 1/ \alpha 3$, $\alpha 4/ \alpha 5/ \alpha 8$ e $\alpha 7/ \alpha 10$. Possui uma fita β antiparalela de cinco filamentos, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 1$ e $\beta 1'$ e, localizada ao fundo da molécula, encontra-se o bolsão de ligação ao ligante, uma grande cavidade muito flexível e hidrofóbica, que lhe permite interagir com moléculas de vários tamanhos e orientações (ORANS *et al.*, 2005). Apesar de o LBD-PXRh possuir várias semelhanças com os outros RN's, dispõe de algumas características distintas como a zona variável entre $\alpha 1$ e $\alpha 3$, que é uma curvatura de 4 resíduos, e duas folhas β a mais que os outros fatores de transcrição (WATKINS *et al.*, 2001).

2.3.3. Mecanismos de Ativação e Repressão

Um modelo clássico da regulação do PXR é por meio do recrutamento de corre reguladores, e esses são divididos em dois grupos, coativadores que ativam a transcrição gênica e correpressores que diminuem ou impedem a transcrição (FRANCIS *et al.*, 2003).

Na presença do ligante o receptor migra do citoplasma para o núcleo da célula, forma um heterodímero com o receptor retinóide X do tipo alfa (RXR α) e recruta complexos de coativadores, que possuem atividade intrínseca de histona acetiltransferase (KHATTAK; RAHMAN), o que enfraquece a ligação das histonas ao DNA e viabiliza a transcrição gênica (CARNAHAN; REDINBO, 2005).

As principais proteínas coativadoras que interagem com o PXR são coativador de receptor nuclear 1 (SRC-1), coativador de receptor nuclear 2 (SRC-2) que compõe a família de coativadores p160, coativador transcricional 1 α (PGC-1 α) (ORANS *et al.*, 2005), proteína 1 que interage com o receptor nuclear (NRIP1) e supressor para GAL-1 (SUG1) (MASUYAMA *et al.*, 2001).

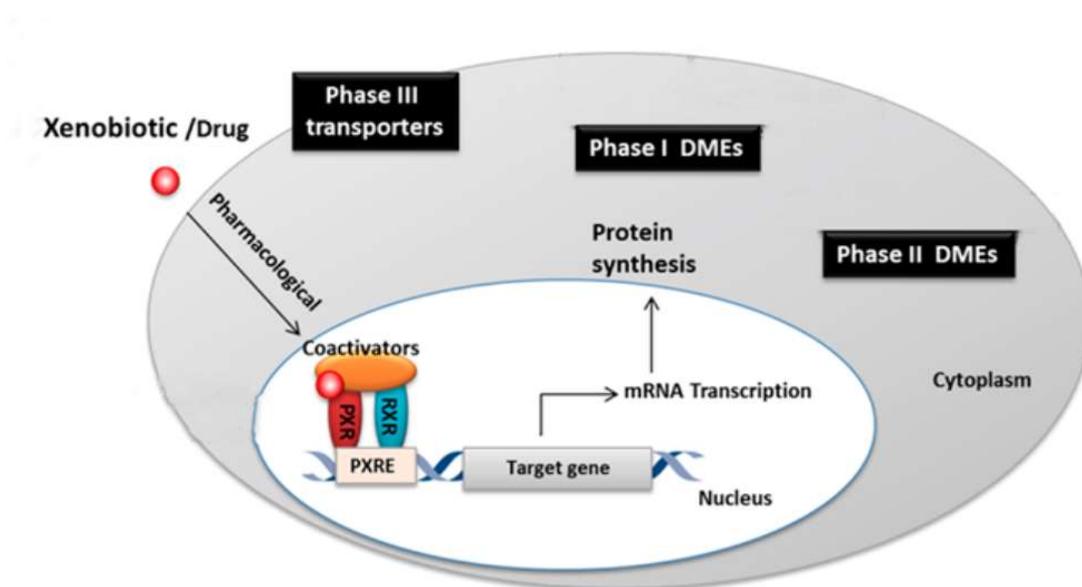


Figura 2. Mecanismo de ação do PXR. Após ligação de um agonista, o receptor PXR forma um heterodímero com o RXR. Em seguida, o heterodímero PXR/RXR interage com o elemento responsivo, levando a uma mudança estrutural que libera os correpressores e recruta complexos de coativadores, viabilizando a transcrição gênica. Adaptado de (WANG, J. *et al.*, 2014).

O complexo dos correpressores possui atividade contrária a dos coativadores, que na ausência do ligante ou na presença de um antagonista, os correpressores recrutam histonas desacetilases (HDAC's) que fortalecem a ligação das histonas ao DNA, consequentemente reprimindo a transcrição gênica (CARNAHAN; REDINBO, 2005).

Os correpressores conhecidos por interagirem funcionalmente com PXR são correpressor 1 de receptor nuclear (NCoR1), correpressor 2 de receptor nuclear (NcoR2) e pequeno parceiro heterodímero (JAKHAR; DAHIYA) (RIGALLI *et al.*, 2018).

2.4. RECEPTOR PREGNANO X NO METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

O PXR funciona como um sensor de xenobióticos, que são substâncias alheias ao organismo, como medicamentos alopáticos e fitoterápicos, que ao entrarem em contato com o organismo, desencadeiam um processo de biotransformação dessas substâncias (MITTAL *et al.*, 2015).

O metabolismo modifica a estrutura química dos compostos, transformando as substâncias lipofílicas em hidrossolúveis, para que as mesmas sejam excretadas pelos rins, e este processo é dividido em três fases, I (oxidação, redução e hidrólise enzimática), II (conjugação) e III (efluxo de metabólitos).

As enzimas da família do citocromo são encarregadas pela fase I, que leva a formação de metabólitos intermediários mediante reações metabólicas redutivas e oxidativas. Ocorre a adição de um oxigênio à substância, formando um grupo OH, enquanto outro oxigênio é convertido em água com o objetivo de aumentar assim sua polaridade para a fase II (GALLI; FEIJOO, 2002; MITTAL *et al.*, 2015).

O citocromo é constituído por 57 genes, expresso em vários tecidos como cérebro, rins, pulmões, intestino e principalmente nos hepatócitos (GUENGERICH, 2006).

A CYP3A4 pertencente à família do citocromo P450 (CYP), que é a isoforma mais abundante da subfamília, é encarregada do metabolismo oxidativo de 40-60 % dos medicamentos. É um grupo formado por várias hemeproteínas responsáveis pelo metabolismo oxidativo de substâncias endógenas e exógenas. A enzima CYP3A4 é

constitutivamente expressa, mas por outro lado apresenta indução da transcrição por um conjunto de compostos como, por exemplo, carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e rifampicina (DANIELSON, 2002; FANG *et al.*, 2017; GOODWIN; HODGSON; LIDDLE, 1999; OGG *et al.*, 1999).

As enzimas da fase II que podem ser reguladas por PXR são: UDP-glucuronosil transferase (UGT), sulfotransferase (SULT) e glutatona-transferase (GST), que tem a função de incorporar moléculas polares aos xenobióticos e/ou endobióticos, gerando metabólitos solúveis em água, não-tóxicos, capazes de serem excretados pelas vias biliares e/ou urinárias (WANG, H.; LECLUYSE, 2003).

A fase III é gerenciada pelos transportadores celulares de captação e efluxo que são constituídos pelos membros da família de proteínas dos cassetes de ligação de ATP (ABC), que são proteínas transmembranares e têm como função bombear drogas para fora das células, utilizando energia da hidrólise de ATP (PRAKASH *et al.*, 2015). Está intimamente relacionada à resistência a múltiplos fármacos na quimioterapia e é alvo importante nas interações medicamentosas (KOTA *et al.*, 2010).

A glicoproteína P (P-gp) é a proteína sintetizada pelo gene ABCB1, também conhecido como multirresistência a drogas 1 (MDR1) e foi o primeiro membro ABC a ser descrito, sendo o PXR o principal fator de transcrição que regula a expressão da P-gp no intestino. Tem como finalidade translocar uma ampla variedade de xenobióticos para o meio extracelular. A P-gp é expressa em vários tecidos normais com função excretora (intestino delgado, fígado e rim) e nas barreiras de tecido sanguíneo (barreira hematoencefálica, barreira hematotesticular e placenta) (FROMM, 2004; GEICK *et al.*, 2001).

2.5. INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA

As interações medicamentosas podem ocorrer pelo mecanismo de ativação ou inativação de reguladores transcricionais de enzimas que metabolizam xenobióticos e um dos reguladores da transcrição de enzimas que metaboliza xenobióticos é o PXR, também denominado de xenosensor (BARTONKOVA; DVORAK, 2018).

O PXR é ativado por uma vasta variedade de esteroides endógenos, xenobióticos e drogas e desempenha um importante papel na mediação de interações medicamentosas perigosas (Tabela 1) (WATKINS *et al.*, 2001).

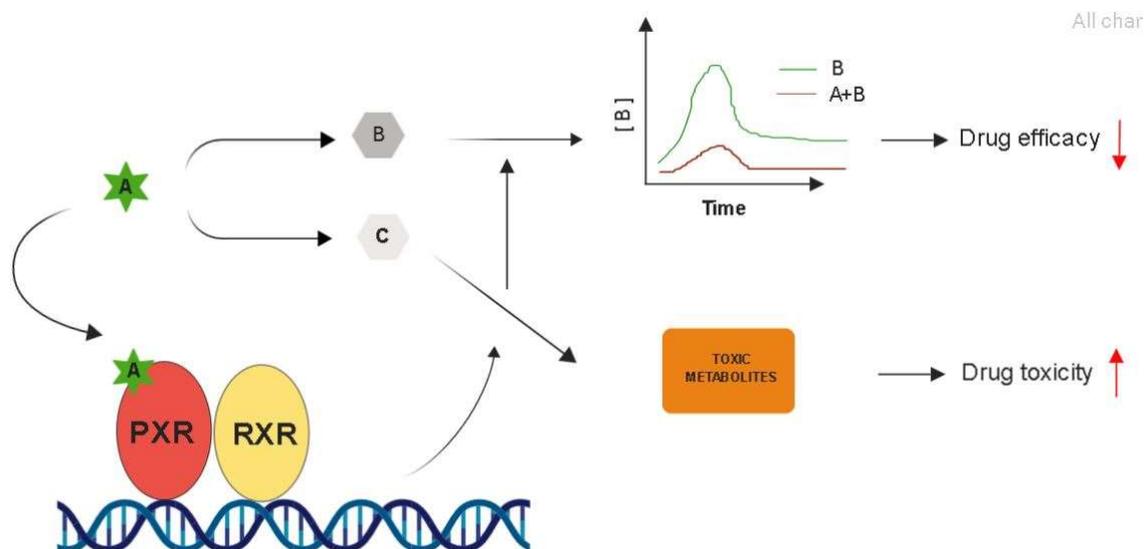


Figura 3. Interações medicamentosas mediadas por PXR. A droga A é agonista de PXR, quando coadministrada com as drogas B ou C aumenta sua metabolização. Na interação ocorrida entre a droga A e B houve uma diminuição na eficácia de B devido à queda em sua biodisponibilidade no organismo. Na interação ocorrida entre a droga A e a droga C, a toxicidade teve um aumento em consequência ao acúmulo de metabólitos tóxicos. Adaptado de (MA, XIAOCHAO; IDLE; GONZALEZ, 2008).

A regulação positiva do PXR pode aumentar o metabolismo de outros agentes terapêuticos administrados simultaneamente, diminuindo sua eficácia clínica. Lau e colaboradores (2010) demonstraram que o ginkgolide A, um fitoquímico da *Ginkgo biloba* L., usada para o comprometimento cognitivo na doença de Alzheimer, ativa o PXR e por isso deve ser usado com precaução por pessoas que fazem uso de medicamentos metabolizados pela CYP3A4 (LAU *et al.*, 2010).

Um estudo *in vitro* conduzido por Gupta e colaboradores (2008) evidenciou que, quando o receptor foi ativado por rifampicina, resultou não apenas na indução da expressão de CYP3A4 mas também do UGT1A1, gene que produz a enzima UDP-glucuronosil transferase (UGT) que participa do metabolismo de fase II. O aumento da expressão da CYP3A4 e da UGT1A1 resultou na resistência ao paclitaxel (Taxol[®]) pela indução transcricional de genes envolvidos no metabolismo de drogas e também conduziu a uma proliferação aumentada de células, indicando que a ativação do PXR induz tanto o crescimento do tumor quanto a resistência à quimioterapia em células de câncer ovariano (GUPTA *et al.*, 2008; WANG, H.; LECLUYSE, 2003).

Antagonistas de PXR reprimem sua atividade transcricional, deslocando um agonista do seu LBD ou inibindo a ligação do agonista ao PXR, levando assim a um bloqueio direto ou alostérico de proteínas como coativadores ou RXR ou fortalecendo as interações com um correpressor, podendo levar a inibição da transcrição das enzimas do metabolismo de xenobióticos. Essa inibição pode desencadear o aumento da atividade farmacológica e isso pode ou não ser um problema, dependendo da janela terapêutica do medicamento coadministrado (CHAI *et al.*, 2016; HOGLE *et al.*, 2018; SMUTNY; PAVEK, 2014).

Tabela 1. Ligantes agonistas do receptor PXR e suas recomendações de uso.

Agonista sintético/semissintético	Indicação de uso/ ação	Referência
Ácido micofenólico	Imunossupressor	(RATAJEWSKI <i>et al.</i> , 2015)
Carbamazepina	Antiepiléptico	(GREWAL <i>et al.</i> , 2017)
Clotrimazol	Antimicótico	(LEHMANN <i>et al.</i> , 1998)
Dexametasona	Anti-inflamatório e imunossupressor	(PASCUSI <i>et al.</i> , 2000; SCHEER <i>et al.</i> , 2010)
Efavirenz	Antirretroviral	(NARAYANAN <i>et al.</i> , 2018)
Glimepirida	Antidiabético	(BECIC; KAPIC; BECIC, 2003; SINZ, M. <i>et al.</i> , 2006)
Isradipina	Anti-hipertensivo, neuroprotetivo (estudo pré-clínicos)	(BIGLAN <i>et al.</i> , 2017; DROCOURT <i>et al.</i> , 2001)
Lovastatina	Anti-hipercolesterolemia	(LEHMANN <i>et al.</i> , 1998)
Metolazona	Diurético	(BANERJEE; CHEN, 2014)
Rifampicina	Antibiótico	(LI; CHIANG, 2005)
Sr 12813	Hipocolesterolêmico	(BERKHOUT <i>et al.</i> , 1996; SHUKLA <i>et al.</i> , 2011)
Topiramato	Anticonvulsivo	(NALLANI <i>et al.</i> , 2003)
Trifluridina	Antiviral e antineoplásica	(RATAJEWSKI <i>et al.</i> , 2015)

Agonista natural	Indicação de uso/ ação	Referência
Erva de São João (<i>Hypericum perforatum</i>)	Antidepressivo	(MOORE <i>et al.</i> , 2000)
Forscolina (<i>Coleus forskohlii</i>)	Hipotireoidismo, doença cardíaca e distúrbios respiratórios	(DING; STAUDINGER, 2005)
Ginkgo (<i>Ginkgo biloba</i>)	Deficiência da memória	(LAU <i>et al.</i> , 2010; YEUNG <i>et al.</i> , 2008)
Kava kava (<i>Piper methysticum</i>)	Ansiedade	(SARRIS <i>et al.</i> , 2013; STAUDINGER; DING; LICHTI, 2006)
Makandi (<i>Echinacea purpurea</i>)	Infecções respiratórias, gripe e resfriado	(AWORTWE <i>et al.</i> , 2015)
Wu Wei Zi (<i>Schisandra chinensis</i>)	Tratamento de dispneia, tosse, diaforese, amnésia e insônia	(MU <i>et al.</i> , 2006; WANG, X. <i>et al.</i> , 2017)
Composto natural isolado	Indicação de uso/ ação	Referência
Colupulona (<i>Humulus lupulus</i>)	Atividade antibacteriana	(SIMPSON; SMITH, 1992; TEOTICO, D. G. <i>et al.</i> , 2008)
Nigramida C (<i>Piper nigrum</i>)	-	(KANNO <i>et al.</i> , 2014)
Piperina (espécies piper)	Antioxidante, melhora função cognição	(CHONPATHOMPIKUNLERT; WATTANATHORN; MUCHIMAPURA, 2010; WANG, Y. M. <i>et al.</i> , 2013)

Cedido gentilmente por SILVA (2019).

2.6. ESPÉCIES VEGETAIS

Para a realização da pesquisa, foram selecionados os extratos de plantas constantes na RENISUS, *Morus nigra* L., *Bidens pilosa* L., *Tagetes minuta*, *Matricaria chamomilla* e *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz, que não faz parte da RENISUS mas muito utilizado como fitoterápico. O método para seleção dos extratos foi a disponibilidade deles no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília.

2.6.1. *Morus nigra* L.



Fonte:(ALMEIDA, 2015; CLAYTONJ_MOTC, 2018)

A *Morus nigra* L. é oriunda da Ásia Ocidental, África, Europa e América e pertence à família Moraceae. É uma árvore de tamanho médio que pode atingir de 6 a 9 metros de altura (KUMAR; CHAUHAN, 2008), conhecida popularmente como amora preta, amoreira ou amora (SAÚDE, 2015c).

2.6.1.1. Uso na medicina popular

Todas as partes, folhas, raízes, frutos e a casca do caule da *M. nigra* são utilizadas na medicina popular, para uso terapêutico antidiabético, redução da obesidade e combate a processos inflamatórios (NADERI *et al.*, 2004; SANCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2016).

2.6.1.2. Efeitos farmacológicos

2.6.1.2.1. Efeito hepatoprotetor

No estudo de Mallhi e colaboradores (2014), o extrato aquoso metanólico da folha de *M. nigra* demonstrou efeito hepatoprotetor. A hepatotoxicidade foi induzida em camundongo com paracetamol 250 mg/ kg. O extrato foi capaz de reduzir os níveis das

enzimas hepáticas aminotransferase glutâmico oxalacética (AST) (MANGELSDORF *et al.*) e aminotransferase glutâmico pirúvica (ALT). Foi demonstrada melhora na necrose dos hepatócitos, inflamação e constrição sinusoidal nos hepatócitos dos camundongos pré-tratados com extrato de *M.nigra* antes da administração do paracetamol (MALLHI *et al.*, 2014). Heng (2015) demonstrou que o extrato etanólico das folhas de *M. nigra* reduziu os níveis ALT, AST e lactato desidrogenase (LDH) do grupo de ratos com hepatotoxicidade induzida por metotrexato (TAG, 2015).

2.6.1.2.2. Atividade antioxidante

Hassanalilou e colaboradores (2017) demonstraram ações antioxidantes do extrato etanólico das folhas de *M. nigra* que inibiram o dano renal e hepático em ratos diabéticos. O diabetes foi induzido em ratos com estreptozotocina e o extrato etanólico da *M. nigra* diminuiu os níveis de creatinina sérica e ureia em relação aos ratos diabéticos do grupo não tratado e também de acordo com o exame histológico, o acúmulo de glicogênio e a degeneração gordurosa dos túbulos convolutos renais foram leves no grupo tratado com o extrato etanólico. O fígado dos ratos diabéticos tratados com o extrato apresentou uma degeneração gordurosa leve e o citoplasma de hepatócitos foi distendido por menor quantidade de gotículas gordurosas em comparação com ratos diabéticos tratados com glibenclamida. Os resultados demonstram que o extrato das folhas de *M. nigra* pode melhorar funções e estruturas renais e hepáticas através da diminuição do estresse oxidativo em ratos diabéticos (HASSANALILOU *et al.*, 2017).

2.6.2. *Bidens pilosa* L.



Fonte: (JOEY, 2019; SUNNETCHAN, 2019)

Bidens pilosa L. é originária da América do Sul e hoje está espalhada por todo o mundo. A planta é de ciclo vegetativo anual, tem estatura média de 1,5 metro e possui flores de 5-15 centímetros de diâmetro. É encontrada principalmente em regiões de clima tropicais e subtropicais e é largamente utilizada na medicina tradicional (GEISSBERGER; SEQUIN, 1991), conhecida popularmente como picão preto, picão ou carrapicho (SAÚDE, 2015a).

2.6.2.1. Uso na medicina popular

As folhas, as raízes e sementes são usadas no combate à malária, feridas, resfriados, gripes e infecções do trato urinário (DAGAWAL; GHORPADE, 2011).

2.6.2.2. Efeitos farmacológicos

2.6.2.2.1. Propriedades analgésicas e anti-inflamatórias

O estudo de Fotso e colaboradores (2014), teve como objetivo avaliar as propriedades analgésicas e anti-inflamatórias do extrato de cloreto de metileno e metanol

das folhas de *B. pilosa*. As propriedades analgésicas de *B. pilosa* foram estudadas usando os modelos de dor induzida por ácido acético, placa quente, capsaicina e dor induzida por formalina. Isso foi seguido por um estudo das propriedades anti-inflamatórias, usando carragenina, dextrano, histamina e serotonina para induzir inflamação aguda na pata traseira de ratos. O extrato gerou redução significativa na dor induzida pelos quatro modelos de nocicepção. Também apresentou atividade anti-inflamatória significativa em todos os quatro modelos de inflamação aguda. Esses resultados mostram que o extrato de *B. pilosa* tem propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (FOTSO *et al.*, 2014).

2.6.3. *Tagetes minuta*



Fonte: (IGMAR, 2016)



Tagetes minuta pertence à família Asteracea. É nativo da América do Sul. É uma espécie aromática de 1-2 m de altura com ciclo vegetativo anual (KUMUD *et al.*, 2010), popularmente conhecida como cravo-de-defunto, cravinho ou chinchilho (SAÚDE, 2015d).

2.6.3.1. Uso na medicina popular

O *T. minuta* é tipicamente empregado como anti-helmíntico, diurético e antiespasmódico (AMAT, 1983). Seu óleo essencial apresenta atividade biocida, acaricida, antifúngica e antimicrobiana (SENATORE *et al.*, 2004).

2.6.3.2. Efeitos farmacológicos

2.6.3.2.1. Atividade antimicrobiana

O extrato metanólico das folhas de *T. minuta* e as frações com diferentes solventes, clorofórmio, acetato de etila e água, apresentaram atividade antimicrobiana contra microorganismos Gram positivos (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram negativos (*Escherichia Coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (TERESCHUK *et al.*, 1997).

2.6.3.2.2. Efeito antifúngico

Foi mostrado por Bii e colaboradores (2000) e Thembo e colaboradores (2010), que o extrato metanólico de *T. minuta* demonstrou eficácia antifúngica contra *Candida krusei*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypsum*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger* e *Penicillium spp* (BII; SIBOE; MIBEY, 2000; THEMBO *et al.*, 2010).

2.6.4. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz



Fonte:(PIOTTER, 2018)

Bryophyllum pinnatum pertence à família Crassulaceae e é conhecida popularmente como coirama, folha-da-fortuna e folha-do-até. É uma suculenta nativa de Madagascar que pode atingir até um metro de altura. Sua espécie é abundante e cresce amplamente em regiões tropicais (OJEWOLE, 2005).

2.6.4.1. Uso na medicina popular

A erva *B. Pinnatum* é comumente usada para o tratamento de litíase renal e insuficiência urinária (YADAV; GULKARI; WANJARI, 2016). É usada também no combate a dores de cabeça, dores de dente, dores de ouvido, infecções oculares, feridas, úlceras, furúnculos, queimaduras e picadas de insetos (KAMBOJ, A.; SALUJA, 2009).

2.6.4.2. Efeitos farmacológicos

2.6.4.2.1. Efeito antilítico

Um estudo realizado no ano de 2016 por Yadav e colaboradores, demonstrou que *B. pinnatum* preveniu a formação de cálculos renais induzidos por etilenoglicol em ratos. Houve uma redução nos níveis séricos de ureia, creatinina, ácido úrico e magnésio no grupo tratado com os extratos alcoólico e hidro alcoólico de *B. Pinattum*. Na histopatologia dos túbulos renais foi verificada pouca ou nenhuma deposição de cristais e mudanças na arquitetura dos rins nos grupos tratados com o extrato dessa planta (YADAV *et al.*, 2016).

2.6.4.2.2. Efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antidiabético

O extrato aquoso de *B. pinnatum* apresentou efeitos antinociceptivos contra estímulos de dor induzido por estímulo térmico (chapa quente) e químico (ácido acético), também reduziu a inflamação aguda induzida por injeções subplantares de albumina de ovo fresco (OJEWOLE, 2005).

2.6.5. *Matricaria chamomilla*



Fonte:(KULBIS, 2017 ; NOVEMBERSYY, 2017)

M. chamomilla é uma herbácea (possui o caule não lenhoso) anual, pertence à família Asteraceae originária da Europa e da Ásia Ocidental. Também conhecida como camomila alemã, camomila húngara, camomila doce, maçanilia ou camomila selvagem. (MCKAY; BLUMBERG, 2006). As flores possuem pétalas brancas e centros amarelos com um aroma doce e frutado. É a partir das flores secas e frescas que são produzidos óleos essenciais, infusões e extratos (SAÚDE, 2015b).

2.6.5.1. Uso na medicina popular

É usada como calmante, antiespasmódico, anti-inflamatório e antisséptico (SHARIFI *et al.*, 2014). Também muito utilizada para o tratamento de lesões da pele como queimaduras e irritações cutânea (SAÚDE, 2015b).

2.6.5.2. Efeitos farmacológicos

2.6.5.2.1. Atividade antiplaquetária

Foi descrito por Pierre e colaboradores (2005) que o extrato aquoso de *M. chamomilla* teve o potencial de inibir, *in vitro*, a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP) e colágeno, bem como toda a agregação sanguínea induzida por colágeno em comparação com os controles (PIERRE; CROSBIE; DUTTAROY, 2005).

2.6.5.2.2. Efeitos antidiabéticos

O extrato etanólico das flores de *M. chamomilla* ativou o receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) e seus isótipos. Em camundongos alimentados com dieta rica em gordura e resistentes à insulina, o extrato reduziu consideravelmente a resistência à insulina, intolerância à glicose, triglicerídeos e colesterol LDL / VLDL (WEIDNER *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que as plantas incluídas neste estudo são utilizadas para fins terapêuticos e que não há descrição na literatura acerca de sua ação sobre o receptor PXR, este projeto teve o propósito de analisar os possíveis efeitos de agonismo ou antagonismo dos extratos aquosos de *Morus nigra* L., *Bidens pilosa* L., *Tagetes minuta*, *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz e *Matricaria chamomilla* sobre o receptor nuclear PXR.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Analisar, *ex vivo*, se os extratos aquosos de *Morus nigra* L., *Bidens pilosa* L., *Tagetes minuta*, *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz e *Matricaria chamomilla* quanto a capacidade de modular a atividade transcricional do receptor nuclear PXR em células HeLa.

4.2. Específicos

- Analisar a toxicidade dos extratos aquosos em células HeLa;
- Avaliar, em células HeLa, a ocorrência de possível agonismo dos extratos aquosos em PXR, utilizando as concentrações determinadas por meio do ensaio de viabilidade celular;
- Avaliar, em células HeLa, se há efeito antagonista dos extratos aquosos que não apresentem atividade agonista sobre o PXR.
- Analisar, em células HeLa, os efeitos dos extratos aquosos sobre o promotor CMV;
- Verificar se há atividade dos extratos aquosos que demonstraram ação agonista sobre o hPXR no receptor TR β .

5. MÉTODOS

Todos os ensaios foram executados nas dependências do Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, no período de 2017 a 2019.

5.1. EXTRATOS AQUOSOS

Os extratos aquosos das plantas *Morus nigra* L., *Bidens pilosa* L., *Tagetes minuta* L., *Matricaria chamomilla* L., *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken selecionados para análise, deu-se a partir da RENISUS, exceto o extrato de *B. pinnatum* pois estava disponível no laboratório.

Os extratos foram doados pela Prof^a. Dra. Dâmaris Silveira, do Laboratório de Controle de Qualidade da Universidade de Brasília.

Os extratos aquosos foram preparados sob a forma de chás (para mimetizar o uso desses extratos pela população), a partir de drogas vegetais, pelo método de infusão com 100g de folhas em 1000 mL de água destilada, que consiste em verter água destilada a 80°C sobre as folhas e acondicionar em um recipiente tampado por 15 minutos (SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016). O material obtido foi filtrado, congelado, liofilizado e acondicionado a -20°C.

Os extratos aquosos a serem usados nos ensaios foram diluídos em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM - Sigma Aldrich[®]).

5.2. CULTURA DE CÉLULAS

No presente estudo, foram utilizadas células HeLa, adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ, oriundas de adenocarcinoma cervical humano, que foram cultivadas em placas para cultivo celular de 150 mm utilizando meio de cultura DMEM com alta concentração de glicose, onde foi adicionado 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich[®]), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma

Aldrich[®]) e 10% de SFB (Soro fetal bovino - Gibco). As células foram acondicionadas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ (LUTZ *et al.*, 2018).

5.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a toxicidade dos extratos vegetais nas células HeLa, foi empregado o ensaio colorimétrico que utiliza o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) (Sigma Aldrich[®]), em placa de cultura de células de 96 poços. O MTT, sal de coloração amarela pálida solúvel em solução aquosa, é reduzido a formazan, sal de coloração arroxeadada e insolúvel em solução aquosa, por meio da quebra do anel tetrazólio pela desidrogenase mitocondrial das células viáveis. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial, ou seja, viabilidade da célula. Os grânulos de formazan são diluídos em solventes orgânicos e podem ser medidos por espectrofotometria em comprimento de onda de 570 nm (MOSMANN, 1983) (SYLVESTER, 2011).

Nesse contexto, cada poço da placa foi semeado com aproximadamente 15.000 células HeLa, ressuspensas em um volume total de 100 µL/poço e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, essas células foram tratadas com concentrações crescentes dos extratos. Foi definido como concentração máxima a ser utilizada do extrato aquoso, aquela que manteve no mínimo 70% de células viáveis. Quando houve precipitação, mesmo com células viáveis, essa concentração foi utilizada. Após incubação a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas, foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL em PBS) em cada poço, seguida por incubação por um intervalo de 2 horas.

Para a total dissolução do sal de formazan, o meio de cultura foi removido da placa por inversão e 100 µL de solução reveladora de MTT (HCl 0,04 M em isopropanol absoluto) foi acrescido em cada poço. A placa foi colocada sob agitação no equipamento shaker orbital (Certomat[®]) por 45 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz.

A absorbância foi determinada a 570 nm em espectrofotômetro de placas (Beckman Couter-DTX800 – Multimode Detector).

Os resultados foram apresentados em forma de porcentagem de células viáveis nos poços tratados com os extratos em relação aos controles, considerados como

100% de viabilidade. Três experimentos independentes foram realizados em replicata de 8. Baseados nesses resultados, conforme referido anteriormente, as concentrações que resultaram em, no mínimo 70%, de viabilidade celular, foram consideradas não citotóxicas (ISO, 2009) e selecionadas para serem usadas nos ensaios de transfecção transitória e gene repórter.

5.4. TRANSFORMAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO

Os plasmídeos empregados no presente estudo foram:

- pM-GAL4-PXR-LBD – quimera que possui o cDNA do domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição de levedura GAL4 fundido ao cDNA do LBD do PXR humano;

- GAL4-LUC – plasmídeo que contém o cDNA do gene da luciferase (gene repórter) regulado pelo elemento responsivo GAL4;

- CMV-LUC – promotor do citomegalovírus (CMV) de expressão constitutiva fusionado ao cDNA do gene da luciferase (gene repórter);

- GAL4-TR β – vetor de expressão que possui o cDNA do LBD de TR β humano fusionado ao DBD de GAL4; e

- PG5-LUC – elemento responsivo de GAL4, fusionado ao gene repórter da luciferase.

O processo de transformação dos plasmídeos acima referidos é definido como a incorporação e expressão do DNA plasmidial em bactéria *Escherichia coli* (DH5 α) (INOUE; NOJIMA; OKAYAMA, 1990). O método envolve dois passos: as células procariontas são, primeiramente, tratadas com Cloreto de Cálcio (CaCl₂) e, em seguida, adicionado o DNA, seguido de um choque térmico de 0 a 42°C. O primeiro passo torna as células competentes para a captação do DNA e o segundo facilita a entrada dos plasmídeos através da membrana da célula (HANAHAN, 1983).

Para a transformação dos DNA's, foram utilizados 50 μ L do vetor de clonagem e 100 ng a 1 μ g do plasmídeo de interesse, que foram inicialmente incubados

por 30 minutos no gelo. Decorrido esse tempo, foi colocado em banho-maria a 42°C por 90 segundos e, de imediato, foi resfriado em gelo por 2 minutos. A seguir, foram adicionado 500 µL de meio Lúria Bertani (LB) (GEICK *et al.*) líquido sem antibiótico incubado por 1 hora a 37°C sob agitação constante. Finalizado esse período, 50 µL do caldo foi adicionado a placa de Petri com meio LB gelificado com 1,5% de ágar e 0,1 mg/mL de ampicilina, antibiótico este que os plasmídeos conferem resistência, e a placa foi incubada por 16 horas em estufa a 37°C.

Para a amplificação das bactérias contendo o plasmídeo de interesse, uma colônia isolada de DH5α foi inoculada em 5 mL de meio LB, contendo ampicilina (60µg/µL) e cultivada a 37°C por 16 horas. Após o período de crescimento, o inóculo foi transferido para 300 mL de meio LB com ampicilina (60µg/µL) a 37°C sob agitação de 250 rpm (Shaker INNOVA[®] 44 – New Brunswick[™]).

A suspensão de micro-organismos foi submetida a centrifugação a 4000 rpm por um período de 15 minutos para separar as células do sobrenadante, o qual foi descartado e os plasmídeos foram purificados utilizando o QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit, de acordo com as instruções do fabricante.

5.5. ENSAIO DE TRANSFEÇÃO TRANSIENTE E GENE REPÓRTER

Procedeu-se a esse ensaio para estimar a ação dos extratos sobre a atividade transcricional do PXR. A transfeção consiste na inserção de ácidos nucleicos em células de mamíferos, que pode ser realizada de maneira química, física ou biológica. É uma ferramenta analítica para o estudo da função e regulação dos genes ou produtos genéticos (GLOVER; LIPPS; JANS, 2005). Assim, os genes transfectados são expressos por um período de tempo restrito pelo fato deles não estarem integrados no genoma (KIM; EBERWINE, 2010).

O ensaio de gene repórter da luciferase é aplicado para monitorar a atividade do promotor ou quantificar a expressão gênica de forma indireta. A enzima luciferase na presença do seu substrato, luciferina (adicionada ao sistema), catalisa a reação, a qual produz uma quantidade de luz proporcional à quantidade de luciferase expressa no ensaio (DE WET *et al.*, 1987).

Para realizar a transfecção, o meio de cultura das células HeLa foi removido e adicionada solução de tripsina a 0,5% para ressuspender as células aderidas. Em seguida, adicionou-se 10 ml de meio de cultura com SFB 10% para interromper a ação da tripsina. Feito isso, as células foram coletadas em tubos de 50 ml e submetidas à centrifugação (2.000 rpm por 5 minutos). Após esses procedimentos, descartou-se o sobrenadante e as células precipitadas no tubo foram ressuspensas em meio de cultura DMEM com Soro Fetal Bovino (SFB) sem antibiótico (ATB), para serem semeadas em uma quantidade aproximada de 22.000 células por poço, ressuspensas em 250 µL/poço em uma placa de 48 poços. Após serem plaqueadas, as células foram colocadas na incubadora a 37°C e 5% CO₂ durante o período noturno.

No dia seguinte, as células foram cotransfectadas com os vetores de expressão utilizando o reagente Lipofectamina (0,5 µL por poço) (*Lipofectamine*[®] 2000-Invitrogen), lipossomos que englobam o DNA, facilitando sua passagem pela parede celular, de acordo com a recomendação do fabricante. Utilizou-se 60 ng de receptor nuclear (pM-Gal4-PXR-LBD ou GAL4-TRβ) e 240 ng do elemento responsivo (GAL4-LUC) por poço.

Para realizar o ensaio de agonismo, seis horas após o término da transfecção, as células foram tratadas com veículo (DMSO), rifampicina 10⁻⁵ e 10⁻⁶ M (controles positivos) e concentrações crescentes dos diferentes extratos diluídos em DMEM sem SFB e ATB, por 20 horas.

Passado esse período, as células foram lisadas com tampão de lise (100 mM tris pH 7,6 e 0,2% de triton 100X q.s.p 100 mL H₂O(d)). Ao lisado celular (10 µL) foi adicionado luciferina (20 µL – substrato da luciferase) presente no kit Luciferase Assay Systems[®] (Promega E4530). A emissão de luz decorrente da reação enzimática entre o produto e o substrato foi quantificada no luminômetro GLOMAX 20/20 (Promega). A atividade da luciferase foi calculada como taxa de ativação (número de vezes) comparada com o veículo. Os experimentos foram realizados em triplicada e repetidos no mínimo 3 vezes.

Para os extratos de produtos vegetais que não apresentaram atividade agonista, foi também realizado investigação para presença de efeito antagonista. Para esse ensaio, 6 horas após a transfecção, as células HeLa foram tratadas com concentrações crescentes dos extratos. Decorridas 4 horas após adição do extrato, adicionou-se ao meio

de cultura DMSO (veículo) ou rifampicina 10^{-6} M (controle positivo) em cada um dos poços tratados com meio de cultura e nos poços dos extratos. Considerando que os ligantes de receptores nucleares necessitam cruzar a membrana plasmática, citoplasma e membrana nuclear, adicionou-se inicialmente os extratos vegetais, pois caso os mesmos possuíssem efeito antagonista, ligariam-se ao LBD do hPXR e impediriam a ligação do agonista (rifampicina). Como uma alta concentração de rifampicina, por exemplo, na concentração 10^{-5} M, pode deslocar o antagonista do receptor e atingir resposta máxima, decidiu-se por usar a rifampicina na dose de 10^{-6} M, pois essa concentração tem 50% do efeito máximo (EC_{50}), dado esse que foi obtido de uma curva dose-resposta feita em estudos prévios em nosso laboratório (RITTER; FLOWER; HENDERSON, 2016; ZHU *et al.*, 2007). A leitura da geração de luciferase foi realizada após 18 horas do segundo tratamento. A atividade da luciferase foi calculada como vezes de ativação comparada com a rifampicina. Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos 3 vezes.

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software utilizado para a análise foi o *GraphPad Prism 7.0* para o sistema operacional Windows. Para a comparação estatística dos resultados entre os diferentes grupos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA one-way) seguido pelo *post hoc* de Bonferroni. Os resultados com valor $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes e apresentados como média \pm erro padrão.

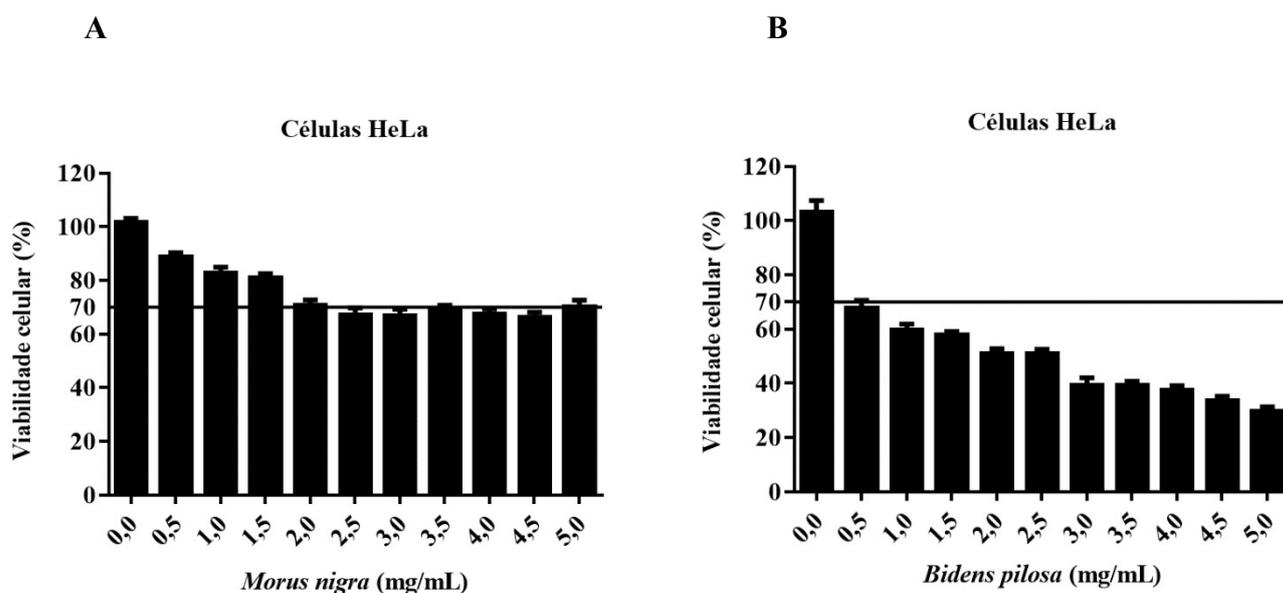
6. RESULTADOS

6.1. Avaliação da citotoxicidade dos extratos aquosos

Inicialmente, realizou-se o ensaio de viabilidade celular para definir as concentrações dos extratos aquosos da *Morus nigra*, *Bidens pilosa*, *Tagetes minuta*, *Matricaria chamomilla* e *Bryophyllum pinnatum* a serem utilizadas nos ensaios de transfecção transiente e gene repórter. Nesses experimentos as concentrações máximas empregadas foram aquelas que resultaram em, no mínimo, 70% de viabilidade celular (ISO, 2009).

O extrato aquoso de *T. minuta*, *M. chamomilla*, e *B. Pinnatum* demonstraram não serem tóxicos para as células HeLa em concentrações de até 2,0 mg/mL (Figura 4 C, D e E). Concentrações maiores não foram utilizadas em função da dificuldade de solubilidade desses extratos. No que se refere ao extrato de *M. nigra* e *B. pilosa*, as concentrações máximas com viabilidade celular foram iguais ou acima de 70% de 1,5 mg/mL e 0,5 mg/mL, respectivamente (Figuras 4 A e 4 B).

Definidas as concentrações máximas não tóxicas, avaliou-se o efeito de concentrações crescentes dos extratos aquosos vegetais em ensaio de transfecção transiente e gene repórter.



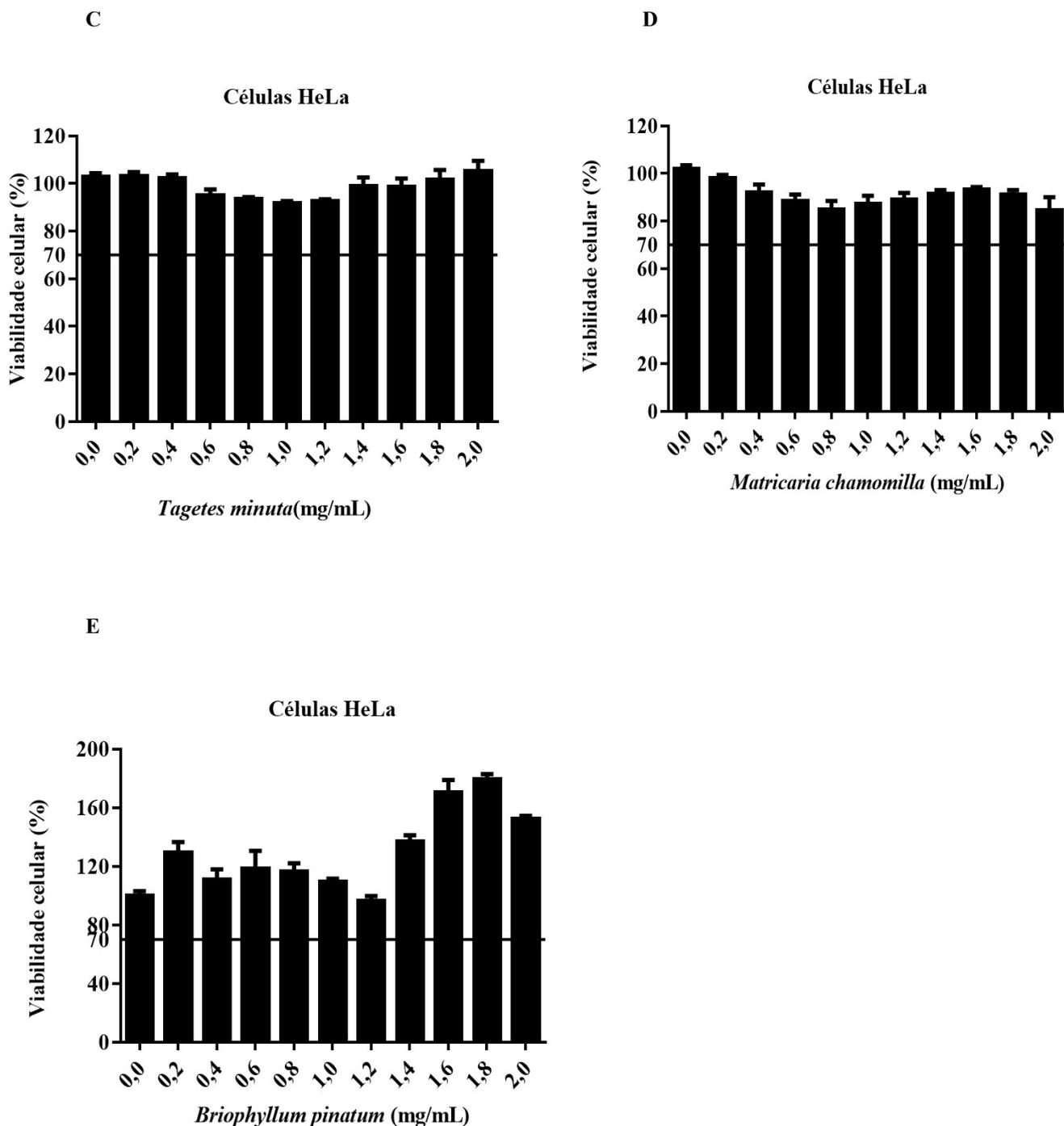


Figura 4 - Ensaio de viabilidade celular com MTT. Células HeLa foram tratadas com concentrações crescentes do extrato aquoso de (A) *Morus nigra*, (B) *Bidens pilosa*, (C) *Tagetes minuta*, (D) *Matricaria chamomilla* ou (E) *Bryophyllum pinnatum* por 24 horas e seguida, as células foram incubadas com MTT por um período de 2 horas. Após a dissolução dos cristais de formazan a absorbância foi quantificada e a viabilidade celular foi determinada em comparação ao controle negativo, considerado como 100%. Resultados de, pelo menos, dois experimentos independentes em replicatas de 8.

6.2. ANÁLISE DO EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSOS NA ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA POR hPXR EM ENSAIOS DE TRANSFEÇÃO TRANSIENTE E GENE REPÓRTER

6.2.1. O extrato de *Morus nigra* não demonstrou efeito sobre a atividade transcricional do hPXR

Para determinar o efeito do extrato aquoso de *M. nigra* sobre a atividade transcricional do hPXR, células HeLa foram cotransfectadas com o pM-GAL4-PXR-LBD e o GAL4-LUC e tratadas com o veículo (DMSO), rifampicina (controle positivo) ou concentrações progressivas do extrato aquoso. Como observa-se na Figura 5, o tratamento das células HeLa com doses crescentes de rifampicina aumentou a atividade transcricional mediada por hPXR em até $6,75 \pm 0,765$ vezes em sua dose mais elevada (10^{-5} M). Por outro lado, o uso do extrato aquoso de *M. nigra* não modificou a atividade transcricional de hPXR mesmo em sua concentração mais elevada (1,4 mg/mL) que foi de $0,93 \pm 0,097$ vezes.

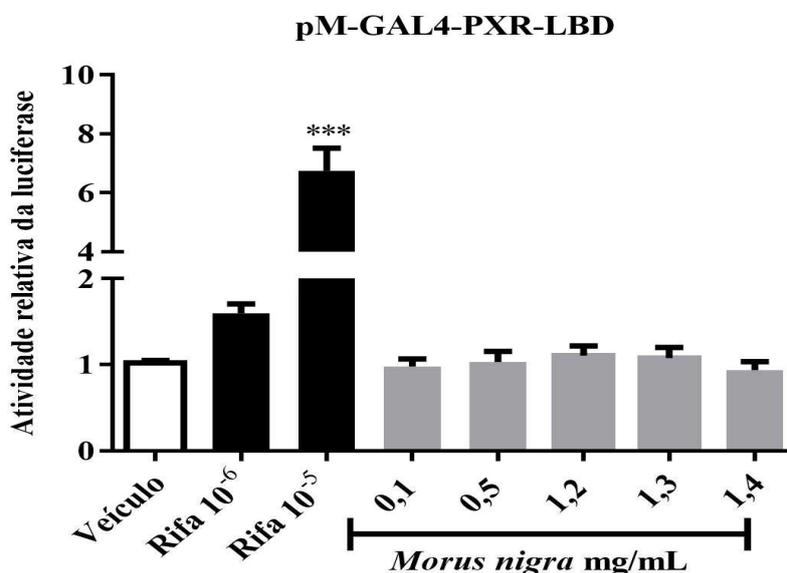


Figura 5- O extrato de *Morus nigra* não alterou a atividade transcricional do receptor nuclear hPXR. Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos pM-GAL4-PXR-LBD e GAL4-LUC e tratadas com veículo DMSO (controle negativo), rifampicina 10^{-6} ou 10^{-5} M (controle positivo) ou concentrações crescentes de até 1,4 mg/mL do extrato de *Morus nigra*. A atividade da luciferase em relação ao veículo foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como vezes de ativação das células tratadas com rifampicina e com extrato, comparadas com as células tratadas com veículo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, pelo menos, dois ensaios independentes em triplicata. *** $p < 0,001$, em comparação ao veículo. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Em consequência do extrato de *M. nigra* não ter se comportado como um agonista, avaliou-se se o composto poderia exercer alguma atividade antagonista sobre o hPXR. Realizaram-se dois tratamentos, sendo o primeiro com concentrações crescentes do extrato, 6 horas após a transfecção, para dar “vantagem” ao suposto antagonista, e o segundo tratamento, 4 horas depois, com a adição de rifampicina (agonista) ao meio de cultura. Caso o extrato apresentasse ação antagonista, há indícios de que se liga ao LBD do hPXR e podendo levar a diminuição da ligação da rifampicina (agonista controle positivo). Contrariamente, não havendo ligação de moléculas do extrato ao sítio de ação do hPXR, nenhum efeito do extrato seria constatado sobre a ação agonista da rifampicina. A adição de *M. nigra* nas concentrações entre 0,1 mg/mL a 1,4 mg/mL não modificou a atividade transcricional induzida pela rifampicina, sugerindo que a *M. nigra* não exerce efeito antagonista sobre o receptor pregnano x (Figura 6).

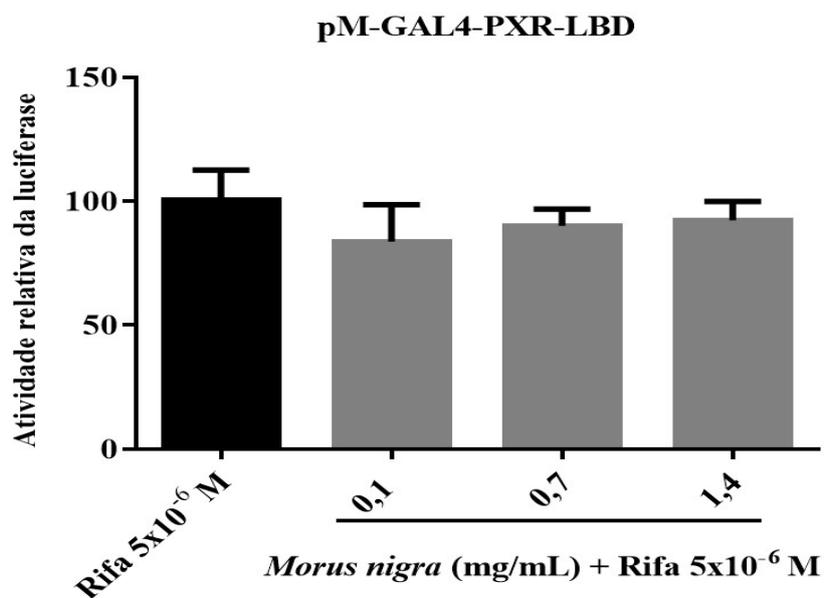


Figura 6- O extrato aquoso de *Morus nigra* não exerceu efeito antagonista sobre o hPXR. Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos pM-GAL4-PXR-LBD e GAL4-LUC e realizaram-se dois tratamentos: o primeiro 6 horas após a transfecção com concentrações crescentes de até 1,4 mg/mL do extrato aquoso de *Morus nigra*, e o segundo 4 horas após o primeiro tratamento, com Rifampicina 5×10^{-6} M. A porcentagem da luciferase em relação a Rifa 5×10^{-6} M foi determinada, após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como porcentagem de ativação das células tratadas com rifampicina. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, pelo menos três ensaios independentes. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Com o objetivo de avaliar se o extrato de *M. nigra* possuía a capacidade de reprimir o promotor CMV (citomegalovírus), que dirige a transcrição do plasmídeo de expressão pM-GAL4-PXR-LBD, ou inibir a enzima da luciferase, foi realizada

transfecção com o repórter CMV-LUC. As concentrações de 0,1 mg/mL a 1,4 mg/mL do extrato aquoso não demonstraram efeitos sobre este promotor (Figura 7).

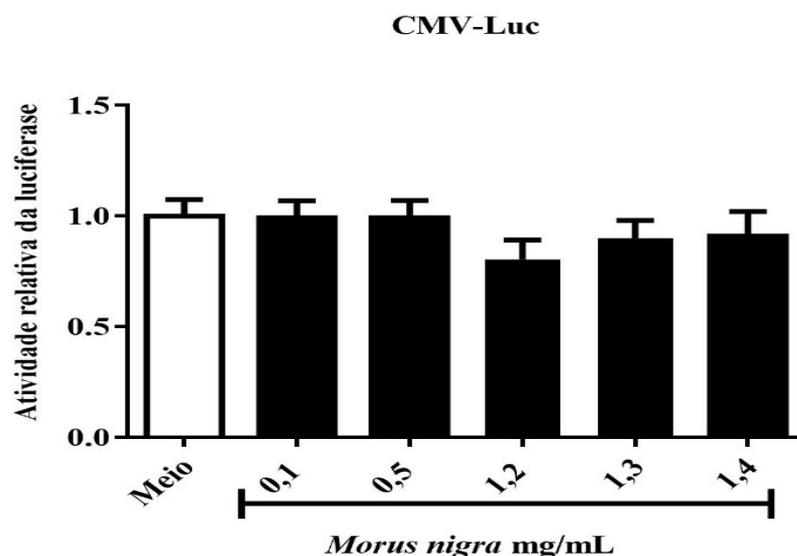


Figura 7- O extrato aquoso de *Morus nigra* não mostrou efeito sobre o CMV-LUC. Células HeLa foram transfectadas com plasmídeo CMV-LUC e tratadas com meio de cultura ou concentrações até 1,4 mg/mL de extrato de *Morus nigra*. A atividade da luciferase foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e representada como vezes de ativação das células tratadas com extrato, comparadas com células tratadas com o meio de cultura. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, no mínimo, dois ensaios independentes. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

6.2.2. O extrato de *Bidens pilosa* não demonstrou efeito sobre a atividade transcricional do hPXR

Em seguida, ao testarmos o extrato de *Bidens pilosa*, observamos que o tratamento das células HeLa com concentrações crescentes do extrato não alteraram a atividade transcricional do hPXR, mesmo em sua concentração mais elevada que foi de 0,5 mg/mL. Ao contrário, a rifampicina, em sua dose mais elevada (10^{-5} M), aumentou a atividade transcricional mediada por hPXR em $4,3 \pm 0,351$ vezes. Esses resultados sugerem que o extrato não tem ação agonista sobre hPXR (Figura 8).

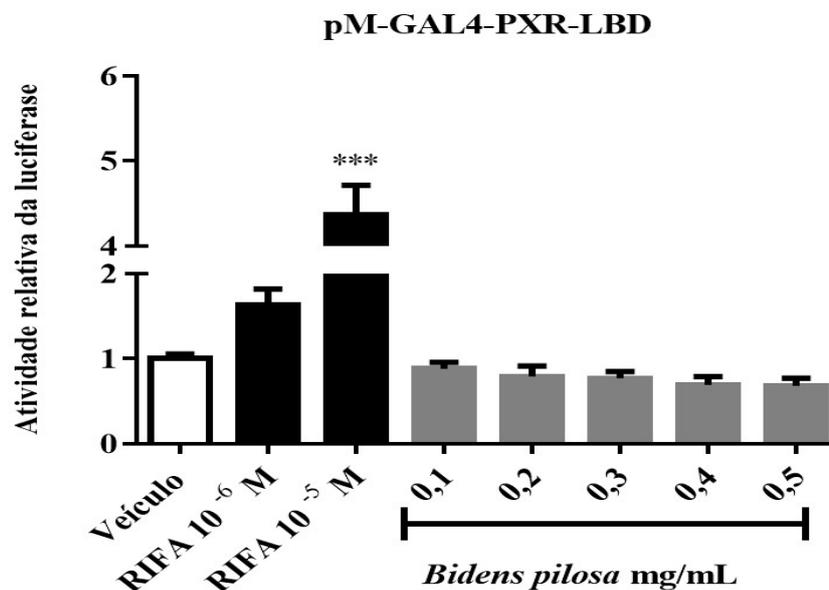


Figura 8- O extrato de *Bidens pilosa* não alterou a atividade transcricional do receptor nuclear hPXR. Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos pM-GAL4-PXR-LBD e GAL4-LUC e tratadas com veículo DMSO (controle negativo), rifampicina 10⁻⁶ ou 10⁻⁵ M (controle positivo) ou concentrações crescentes de até 0,5 mg/mL do extrato aquoso de *Bidens pilosa*. A atividade da luciferase em relação ao veículo foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como vezes de ativação das células tratadas com rifampicina e com extrato, comparadas com as células tratadas com veículo. Os dados foram expressos como média ± erro padrão de, pelo menos, dois ensaios independentes em triplicata. *** $p < 0,001$, em comparação ao veículo. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Como o extrato aquoso de *B. pilosa* não apresentou ação agonista para hPXR, foi decidido investigar uma possível ação antagonista.

A concentração máxima não tóxica do extrato aquoso de *B. pilosa* foi de 0,5 mg/mL no ensaio de viabilidade celular. Contudo, o reagente lipofectamina, lipossomo catiônico utilizado na transfecção transiente, aliado ao extrato aumentou a toxicidade. Por isso, a concentração máxima do extrato de *B. pilosa* foi ajustada para 0,25 mg/mL.

Nas concentrações de 0,1 e 0,25 mg/mL, observa-se que não houve alteração da atividade transcricional induzida pela rifampicina, ou seja, o extrato de *B. pilosa* não possui atividade antagonista sobre hPXR.

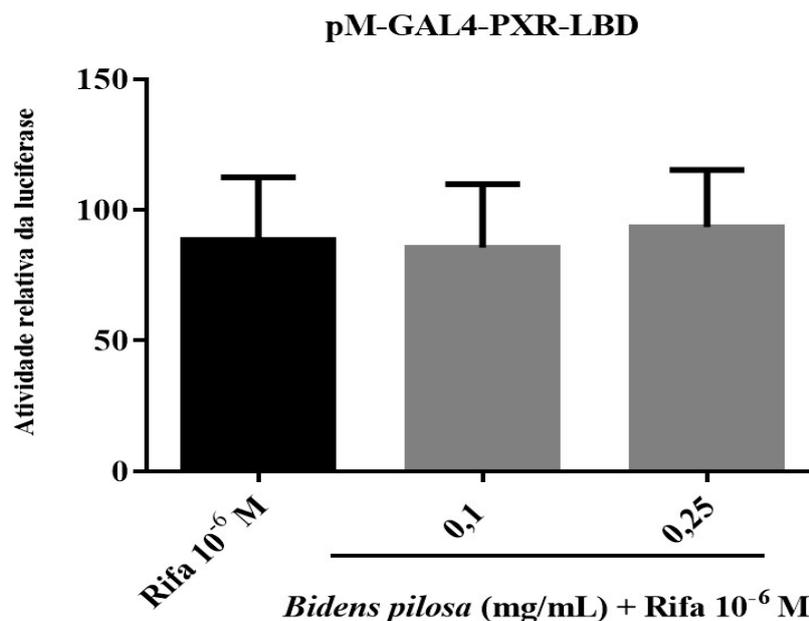


Figura 9- O extrato aquoso de *Bidens pilosa* não exerceu efeito antagonista sobre o hPXR. Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos pM-GAL4-PXR-LBD e GAL4-LUC e realizaram-se dois tratamentos, o primeiro 6 horas após a transfecção com concentrações crescentes de até 0,25 mg/mL do extrato aquoso de *Bidens pilosa*, e o segundo 4 horas após o primeiro tratamento, com rifampicina 10^{-6} M. A porcentagem da luciferase em relação a Rifa 10^{-6} M foi determinada, após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como porcentagem de ativação das células tratadas com rifampicina. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, pelo menos dois ensaios independentes. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Para averiguar se a *B. pilosa* exerceu interferência sobre a atividade do promotor que dirige a luciferase, o ensaio com o plasmídeo CMV-LUC foi efetuado e nossos resultados demonstraram que não houve mudança na atividade transcricional em nenhuma das concentrações.

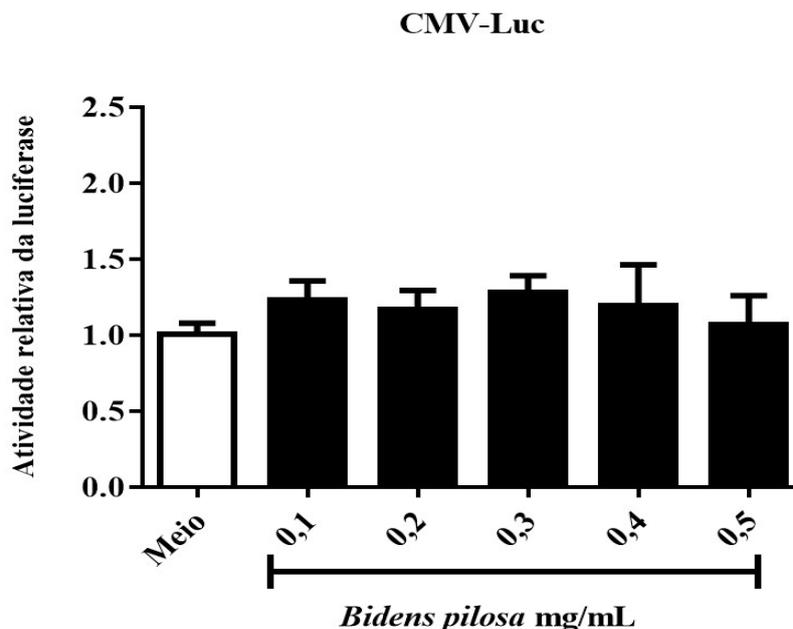


Figura 10- O extrato aquoso de *Bidens pilosa* não demonstrou efeito sobre o promotor CMV-LUC. Células HeLa foram transfectadas com plasmídeo CMV-LUC e tratadas com meio de cultura ou concentrações até 0,5 mg/mL de extrato de *Bidens pilosa*. A atividade da luciferase foi determinada, após 20h de tratamento, no luminômetro e representada como vezes de ativação das células tratadas com extrato, comparadas com células tratadas com meio. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, no mínimo, dois ensaios independentes. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

6.2.3. O extrato de *Tagetes minuta* não demonstrou efeito sobre a atividade transcricional do hPXR

Ao testar-se o efeito do extrato de *Tagetes minuta* sobre a transcrição mediada por hPXR, observou-se um discreto aumento da ativação transcricional, chegando a $2,9 \pm 0,910$ vezes, quando comparado ao controle negativo (veículo). Porém, em função de uma dispersão do erro padrão da média (EPM), esse resultado não foi estatisticamente significativo. Esses resultados sugerem que esta espécie vegetal não possui compostos capazes de agirem como agonistas no receptor hPXR.

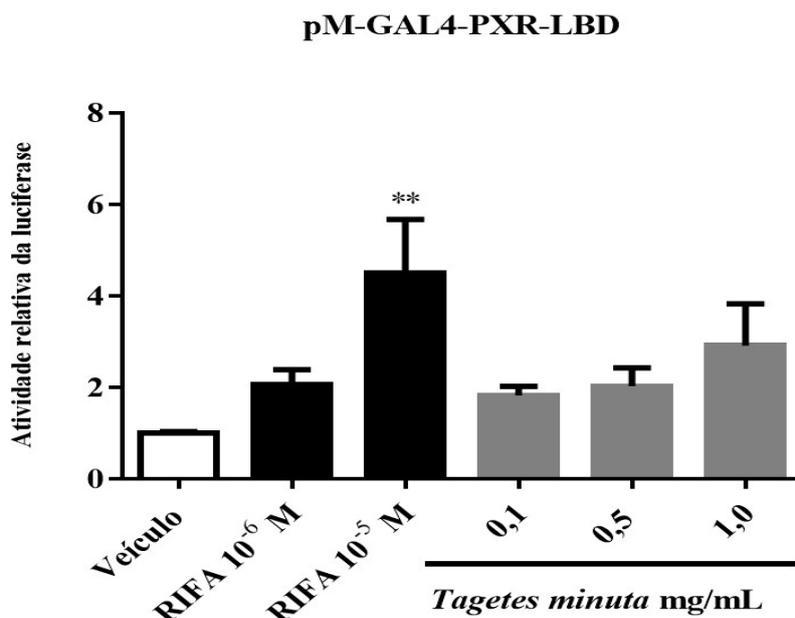


Figura 11- O extrato de *Tagetes minuta* não alterou a atividade transcricional do receptor nuclear hPXR. Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos pM-GAL4-PXR-LBD e GAL4-LUC e tratadas com veículo DMSO (controle negativo), Rifampicina 10^{-6} ou 10^{-5} M (controle positivo) ou concentrações crescentes de até 1,0 mg/mL do extrato de *Tagetes minuta*. A atividade da luciferase em relação ao veículo foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como vezes de ativação das células tratadas com rifampicina e com o extrato, comparadas com as células tratadas com veículo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, pelo menos, dois ensaios independentes em triplicata. ** $p < 0,05$, em comparação ao veículo. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Com base no resultado anterior, onde foi visto que não houve atividade agonista, realizou-se então o ensaio de antagonismo. Os resultados mostraram que o extrato de *T. minuta* não modificou a atividade transcricional de hPXR, mesmo em suas concentrações mais altas, demonstrando não possui atividade antagonista.

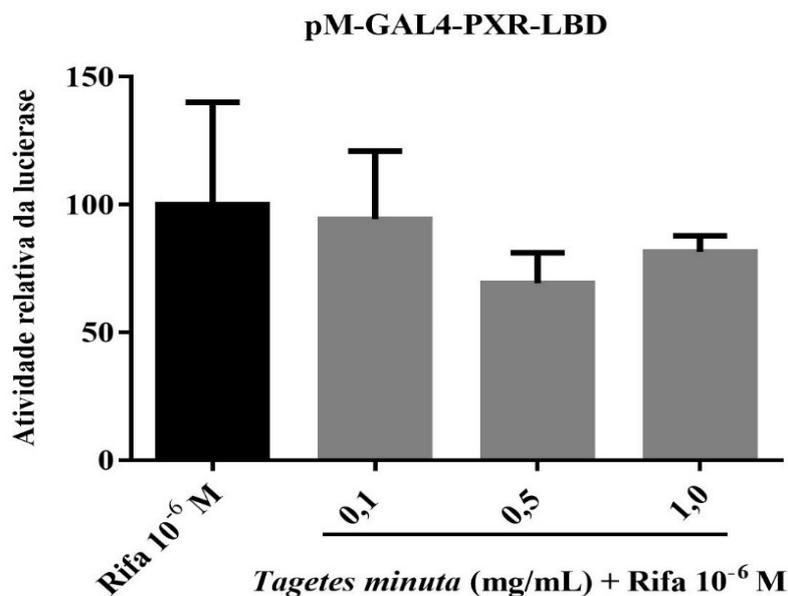


Figura 12- O extrato aquoso de *Tagetes minuta* não exerceu efeito antagonista sobre o hPXR. Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos pM-GAL4-PXR-LBD e GAL4-LUC e realizaram-se dois tratamentos, o primeiro 6 horas após a transfecção com concentrações crescentes de até 1,0 mg/mL do extrato aquoso de *Tagetes minuta*, e o segundo 4 horas após o primeiro tratamento, com rifampicina 10^{-6} M. A porcentagem da luciferase em relação à Rifa 10^{-6} M foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como porcentagem de ativação das células tratadas com rifampicina. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, pelo menos três ensaios independentes. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

O extrato aquoso de *T. minuta* também não modificou a atividade do plasmídeo CMV-LUC.

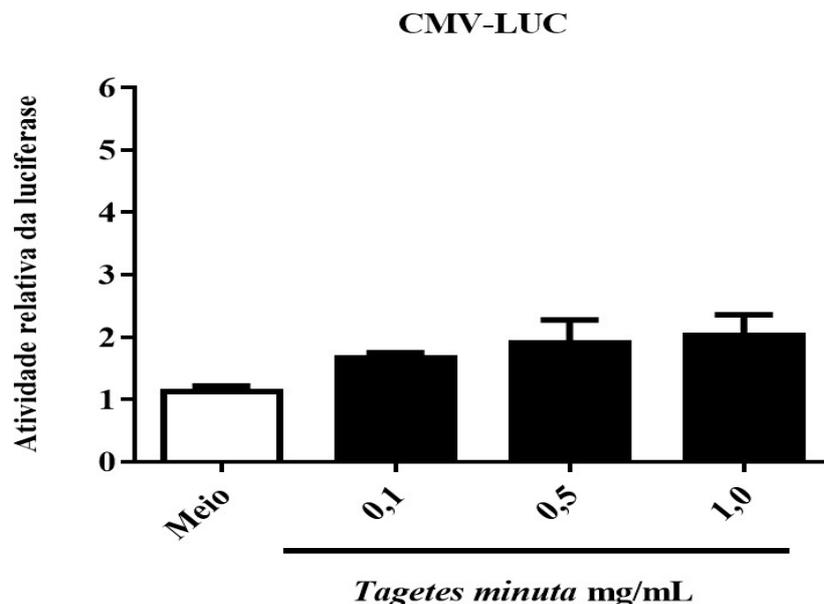


Figura 13- O extrato aquoso de *Tagetes minuta* não demonstrou efeito sobre o promotor CMV-LUC. Células HeLa foram transfectadas com plasmídeo CMV-LUC e tratadas com meio de cultura ou concentrações até de 1,0 mg/mL de extrato de *Tagetes minuta*. A atividade da luciferase foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e representada como vezes de ativação das células tratadas com extrato, comparadas com células tratadas com o meio de cultura. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, no mínimo, dois ensaios independentes realizados em triplicata. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

6.2.4. O extrato de *Matricaria chamomilla* não alterou a atividade transcricional mediada pelo receptor hPXR

Testou-se também o extrato aquoso de *Matricaria chamomilla* e observou-se que o extrato aquoso não alterou a atividade transcricional mediada por hPXR, sugerindo que essa espécie não possui compostos capazes de agir como agonistas de hPXR.

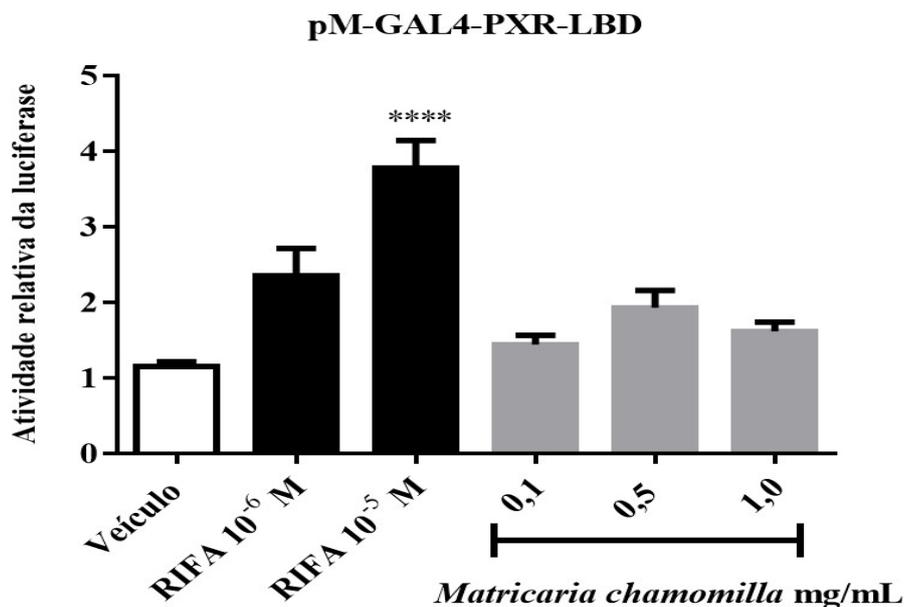


Figura 14- O extrato de *Matricaria chamomilla* não alterou a atividade transcricional do receptor nuclear hPXR. Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos pM-GAL4-PXR-LBD e GAL4-LUC e tratadas com veículo DMSO (controle negativo), rifampicina 10⁻⁶ ou 10⁻⁵ M (controle positivo) ou concentrações crescentes de até 1,0 mg/mL do extrato de *Matricaria chamomilla*. A atividade da luciferase em relação ao veículo foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como vezes de ativação das células tratadas com rifampicina ou como extrato, comparadas com as células tratadas com veículo. Os dados foram expressos como média ± erro padrão de, pelo menos, três ensaios independentes em triplicata. ****p<0,0001, em comparação ao veículo. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Da mesma forma como anteriormente discutido, como o ensaio não mostrou ação agonista em hPXR, realizou-se o ensaio de antagonismo. Assim, observou-se que o tratamento das células HeLa com extrato aquoso de *M. chamomilla* não modificou a atividade transcricional induzida pela rifampicina 10⁻⁶ M (controle positivo), mesmo em suas concentrações mais elevadas. Assim, conclui-se que o extrato aquoso de *M. chamomilla* não é um antagonista de hPXR.

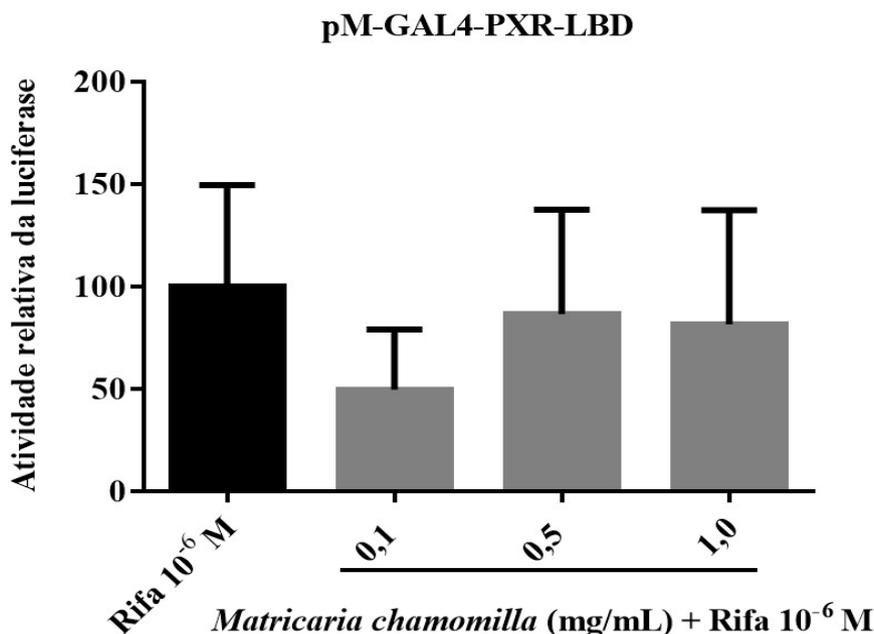


Figura 15- O extrato aquoso de *Matricaria chamomilla* não exerceu efeito antagonista sobre o hPXR. Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos pM-GAL4-PXR-LBD e GAL4-LUC e realizaram-se dois tratamentos, o primeiro 6 horas após a transfecção com concentrações crescentes de até 1,0 mg/mL do extrato aquoso de *Matricaria chamomilla*, o segundo de 4 horas após o primeiro tratamento, com Rifampicina 10^{-6} M. A porcentagem da luciferase em relação a Rifa 10^{-6} M foi determinada, após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como porcentagem de ativação das células tratadas com Rifampicina. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. O teste estatístico utilizado foi o método de variância *one-way* ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

6.2.5. O extrato aquoso de *Bryophyllum pinnatum* exerceu atividade agonista sobre o receptor hPXR

Diferentemente dos extratos estudados anteriormente, o tratamento com extrato aquoso de *Bryophyllum pinnatum* induziu aumento significativo da atividade transcricional do hPXR, em cerca de $7,3 \pm 1,007$ e $19,3 \pm 1,637$ vezes nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL respectivamente ($p < 0,0001$). Inclusive, a maior dose do extrato aquoso de *B. pinnatum* produziu um aumento da transcrição 3,85 vezes maior ($p < 0,0001$) que o valor alcançado pela rifampicina em sua dose máxima (10^{-5} M), que foi de 5,0 vezes (Figura 16). Conseqüentemente, o extrato aquoso de *B. pinnatum* demonstrou possuir compostos que agem como agonistas do hPXR.

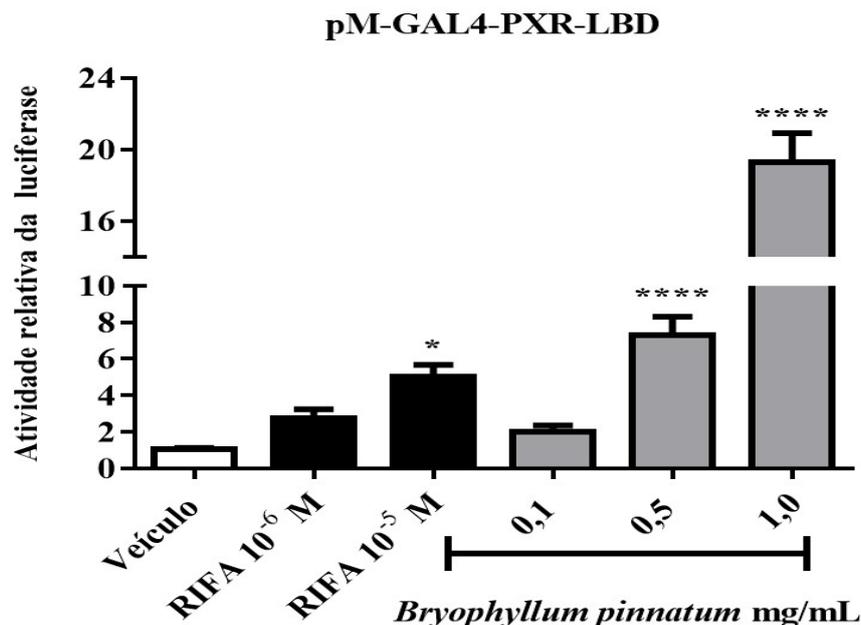


Figura 16- O extrato aquoso de *Bryophyllum pinnatum* é agonista de hPXR. Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos pM-GAL4-PXR-LBD e GAL4-LUC e tratadas com veículo DMSO (controle negativo), rifampicina 10⁻⁶ ou 10⁻⁵ M (controle positivo) ou concentrações crescentes de até 1,0 mg/mL do extrato de *Bryophyllum pinnatum*. A atividade da luciferase em relação ao veículo foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como vezes de ativação das células tratadas com rifampicina e as concentrações do extrato, comparadas com as células tratadas com veículo. Os dados foram expressos como média ± erro padrão de, pelo menos, dois ensaios independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$, em comparação ao veículo. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Para atestar a provável especificidade da interação entre *B. pinnatum* e hPXR, realizou-se o teste de gene repórter do extrato em outro receptor nuclear, o receptor de hormônio tireoidiano do tipo beta (hTR β). A finalidade desse ensaio foi demonstrar que *B. pinnatum* modifica a atividade transcricional apenas de hPXR, ou seja, age de modo específico. Com o propósito de dar continuidade à avaliação, células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos GAL4-hTR β e o repórter PG5-LUC e tratadas com concentrações progressivas do extrato ou de hormônio tireoidiano (T₃ 10⁻⁶M). O ensaio indicou que o extrato de *B. pinnatum* não ativou a transcrição mediada por hTR β , sugerindo uma especificidade de *B. pinattum* como agonista de hPXR (figura 17).

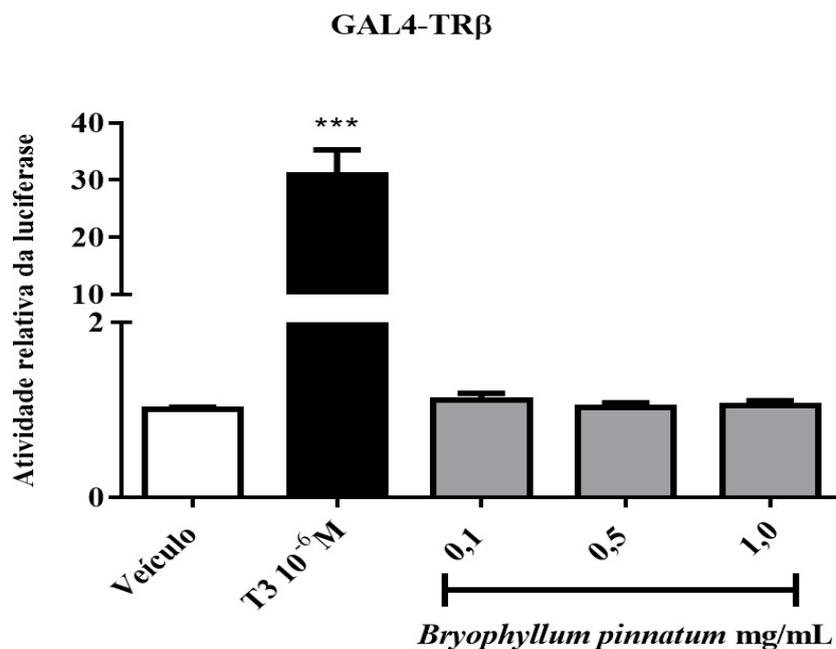


Figura 17- O extrato aquoso de *Bryophyllum pinnatum* não alterou a atividade transcricional do hTR β . Células HeLa foram cotransfectadas com os plasmídeos GAL4-TR β e o PG5-LUC e tratadas com veículo (DMSO + etanol, controle negativo), triiodotironina (T3) 10⁻⁶ M (controle positivo) ou concentrações de até 1,0 mg/mL do extrato de *Bryophyllum pinnatum*. A atividade da luciferase em relação ao veículo foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e caracterizada como vezes de ativação das células tratadas com T3 e as concentrações do extrato, comparadas com as células tratadas com veículo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, no mínimo, dois ensaios independentes realizados em triplicatas. *** $p < 0,001$, em comparação ao veículo. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Para averiguar se o extrato de *B.pinnatum* poderia influenciar na atividade do promotor, foi realizada transfecção com o repórter CMV-LUC. Os resultados indicaram que em nenhuma das concentrações do extrato aquoso exerceu efeito sobre o promotor (figura 18).

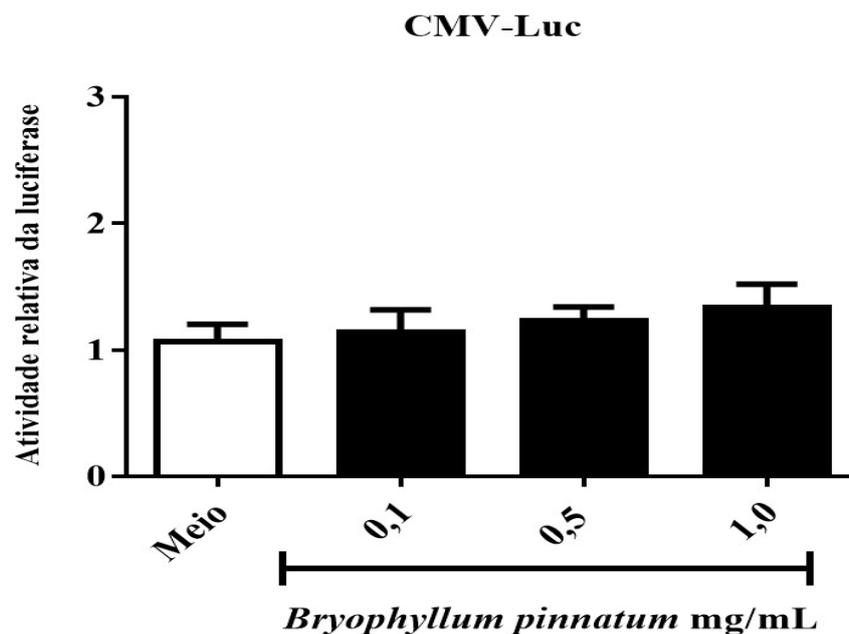


Figura 18- O extrato aquoso de *Bryophyllum pinnatum* não demonstrou efeito sobre o promotor CMV-LUC. Células HeLa foram transfectadas com plasmídeo CMV-LUC e tratadas com meio de cultura e concentrações de até 1,0 mg/mL de extrato aquoso de *Bryophyllum pinnatum*. A atividade da luciferase foi determinada após 20h de tratamento, no luminômetro e representada como vezes de ativação das células tratadas com extrato aquoso, comparadas com células tratadas com meio de cultura. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de, no mínimo, dois ensaios independentes em triplicata. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA *one-way*, seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni.

7. DISCUSSÃO

Atualmente, o mundo todo faz uso de medicamentos à base de plantas medicinais, tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. No Brasil, o uso desses produtos encontra-se em plena expansão com a implantação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS. No ano de 2018, 2.160 Unidades Básicas de Saúde disponibilizaram fitoterápicos ou plantas medicinais e também 12 medicamentos fitoterápicos distribuídos em 14 estados que estão incluídos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (MS, 2018a).

Os medicamentos fitoterápicos e as plantas medicinais estão se tornando cada vez mais populares devido à sua grande aceitação como tratamento alternativo em virtude de fatores culturais que apontam que, por serem naturais, são livres de perigos, mesmo em sua maioria, não se conhecendo os possíveis mecanismos de ação, assim como também pela falta de estudos clínicos que comprovem sua eficácia e segurança (ANVISA, 2010a; PARVEZ; RISHI, 2019). É ainda importante observar que comumente esses produtos são usados juntamente com medicamentos alopáticos, fato este que aumenta a probabilidade de interações medicamentosas.

As interações medicamentosas são classificadas em farmacocinéticas e farmacodinâmicas. As interações farmacocinéticas podem comprometer absorção, distribuição, metabolização ou excreção e as interações farmacodinâmicas ocorrem mediante uma alteração no efeito farmacológico desejado devido a ação dos fármacos envolvidos nos mesmos receptores ou enzimas (MAMINDLA; K.V.S.R.G; KOGANTI, 2016).

Uma das interações medicamentosas, de natureza farmacocinética, muito frequente e conhecida, entre produtos naturais e medicamentos alopáticos, tem como principal mecanismo o aumento ou diminuição da expressão das enzimas da classe das CYPS, particularmente a CYP3A4, pertencente à subfamília de enzimas metabólicas do citocromo P450 (YANG *et al.*, 2006). A modulação da expressão da CYP3A4 ocorre por ativação ou inibição da transcrição gênica regulada pelo receptor nuclear dependente de ligante, PXR (ROSETTE *et al.*, 2019). O exemplo mais marcante foi descrito pelo uso da erva de São João, um fitoterápico muito utilizado no tratamento da depressão (ASSIRI *et al.*, 2017). Nesse extrato, a hiperforina, um bioativo da erva de São João, ativa a

transcrição gênica mediada por PXR e induz o aumento e a atividade da enzima CYP3A4 induzindo o metabolismo de várias drogas como contraceptivos orais e ciclosporina (MOORE *et al.*, 2000).

Resultados semelhantes foram observados em vários trabalhos com diferentes espécies vegetais em que ativaram hPXR. Okada *et al.* (2017) demonstraram que o extrato etanólico de *Aurantii fructus immaturus* e *Citri unshiu pericarpium*, que é utilizado em fitoterápicos para auxiliar a perda de peso, induziram expressão da CYP3A4 via PXR. Kanno *et al.* (2017) mostraram que o Alisol B 23-acetato, composto isolado dos rizomas de *Alisma orientale* muito utilizado na medicina tradicional chinesa, causou um aumento dose-dependente da transcrição gênica do receptor PXR e Fasinu *et al.* (2017) verificaram que *Argermone mexicana*, *Momordica charantia*, *Phyllanthus amarus* e *Tithonia diversifolia*, todos utilizados como antimalárico, induzem a atividade do receptor PXR. A importância desse mecanismo de interação medicamentosa vem aumentando de forma progressiva com a descoberta de novos extratos que atuam sobre PXR. Assim, recentemente, Al-Dosari e Parvez (2019) demonstraram o potencial de indução do gene CYP3A4 mediado por PXR de quatro plantas com potencial terapêutico, sendo elas, *Dodonaea angustifolia*, *Euphorbia tirucalli*, *Alternanthera pungens* e *Ficus palmata*.

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis efeitos das plantas mencionadas, em sua maioria da RENISUS, sobre a atividade transcricional do receptor PXR. Essa informação é muito importante para a incorporação segura, eficaz e de qualidade da fitoterapia no SUS.

O início desses estudos deu-se pelo ensaio de viabilidade celular, que objetivou determinar a toxicidade dos extratos aquosos em células HeLa. Os extratos de *T. minuta*, *M. chamomilla*, e *B. Pinatum* demonstraram não serem tóxicos para as células HeLa em concentrações de até 2,0 mg/mL. O extrato de *B. pilosa* na concentração de 0,5 mg/mL e *M. nigra* na concentração de 1,5 mg/mL, concentrações máximas não tóxicas, reduziram o percentual de células viáveis em torno de 32% e 20% respectivamente, levando a serem as concentrações escolhidas para os próximos ensaios.

Para dar início aos estudos sobre a atividade transcricional do receptor nuclear PXR, foram realizados ensaios de transfecção e gene repórter, com o propósito de avaliar se os candidatos a ligantes iriam ativar a atividade transcricional de PXR possivelmente

através da ligação ao LBD do PXR, promovendo um possível efeito agonista ou antagonista.

O extrato aquoso de *M. nigra* não modulou a atividade transcricional de PXR de maneira significativa em relação ao veículo, resultado corroborando o estudo de Mazzari (2017), que observou em células HepG2, que o extrato aquoso de *M. nigra* não modificou a expressão de CYP3A4 avaliada pelo ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Um outro estudo foi realizado por Franzotti (2006), que tratou células U937 (originária linfoma histiocítico difuso) com extrato de *M. nigra* em frações hexânica e aquosa na concentração de 0,04 mg/mL e avaliou a atividade transcricional do receptor nuclear de estrogênio em suas isoformas α e β . Como resultado, não foi observada ação agonista do extrato sobre as duas isoformas do receptor de estrogênio.

O outro derivado vegetal constante na RENISUS testado foi o *B. pilosa* e os resultados não demonstraram atividade agonista ou antagonista sobre PXR. Nossos resultados são similares aos de Santos (2012), no que diz respeito ao derivado vegetal não possuir compostos capazes de agirem no receptor de PXR, apesar do ensaio de transfecção utilizado no referido estudo ter sido por eletroporação e não lipofectamina, utilizada no presente trabalho. Adicionalmente, Mazzari (2017) também observou que o extrato aquoso de *B. pilosa* não modulou a expressão gênica da CYP3A4, apesar de ter utilizado uma concentração de 0,1 mg/mL, menor que a concentração máxima utilizada em nossos experimentos, que foi de 0,5 mg/mL.

No presente trabalho, o tratamento com as espécies vegetais *T. minuta* e *M. chamomilla* também não modularam a atividade transcricional de hPXR. Até o momento, esses foram os primeiros estudos que avaliaram o efeito do extrato aquoso da *T. minuta* e *M. chamomilla* sobre hPXR. Em outro estudo desenvolvido por Ganzera e colaboradores (2006), analisando o efeito do óleo essencial e suas frações, das flores de *M. chamomilla* sobre as enzimas do citocromo P450 demonstrou-se que o óleo essencial bruto inibiu a atividade da CYP3A4 e os spiroéteres (um dos constituintes do óleo essencial) apresentaram uma maior inibição da enzima CYP3A4 quando comparados ao óleo bruto. Isso nos mostra que algumas preparações com *M. chamomilla* podem inibir a atividade da enzima metabolizadora CYP3A4, levando a possíveis interações medicamentosas cuja

via de eliminação da droga seja por esse mecanismo. Contudo, nesse estudo, Ganzera e cols. não avaliaram a expressão de PXR.

De forma distinta ao observado nos extratos supracitados, o *B. pinnatum* ou folha da fortuna, que não faz parte da RENISUS, demonstrou atividade agonista sobre PXR. *B. pinnatum* é comumente utilizada para o tratamento de diversas patologias como litíase renal, insuficiência urinária (YADAV *et al.*, 2016), cefaléia e outros sintomas álgicos (KAMBOJ, A.; SALUJA, 2009). Nos ensaios de gene repórter, *B. pinnatum* ativou a transcrição mediada por PXR em até 19 vezes, maior até que nosso controle positivo, a rifampicina. Esse resultado demonstra nitidamente que o derivado vegetal *B. pinnatum* deve ser usado com muita ponderação, pois ao ativar o receptor PXR poderá haver um aumento da expressão de CYP3A4, contribuindo para estimular o metabolismo de diversos medicamentos. A enzima CYP3A4 é responsável por metabolizar mais ou menos 60% dos fármacos usados na clínica. Reunindo esses dados, pode-se recomendar que a coadministração de *B. pinnatum* com outros medicamentos pode causar interação medicamentosa, diminuindo os níveis plasmáticos de outros medicamentos. Devido a relevância da CYP3A4 no metabolismo dos medicamentos, se faz necessário investigar o maior número possível de compostos que interferem na atividade transcricional de hPXR para diminuir a possibilidade de interações medicamentosa por esse mecanismo (FANG *et al.*, 2017; GOODWIN *et al.*, 1999; MITTAL *et al.*, 2015; OGG *et al.*, 1999).

Até o momento, nenhum outro estudo avaliou o efeito do extrato aquoso de *B. pinnatum* sobre a atividade transcricional regulada pelo receptor nuclear hPXR. Contudo, uma limitação do nosso estudo, é que não avaliamos a modulação da expressão da CYP3A4 em células hepáticas ou a atividade enzimática da CYP3A4 pelo uso do extrato aquoso de *B. pinnatum*. Novos estudos, preferencialmente em cultura primária de fígado, poderão comprovar ou não o efeito do extrato aquoso de *B. pinnatum*.

Em vários países, o uso de fitoterápicos vem crescendo como opção de medicina alternativa, devido à crença de que ser natural é inofensivo. As plantas medicinais e os fitoterápicos possuem ações farmacológicas e toxicológicas, como os medicamentos alopáticos, assim o seu uso deve ser feito de maneira racional pois há possibilidade de ocorrer efeitos adversos e interações medicamentosas. Os resultados obtidos reforçam a relevância de pesquisas sobre os efeitos dos fitoterápicos e plantas medicinais a fim de evitar reações adversas e obter medicamentos seguros e eficazes para terapêutica.

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados apontam que a administração de *Bidens pilosa* L., *Matricaria chamomilla*, *Morus nigra* L. e *Tagetes minuta* não ativam PXR, sugerindo não mediar o metabolismo de outras drogas via PXR. Por outro lado, o extrato de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz possui compostos agonistas de hPXR. Assim, sua administração com outros medicamentos pode causar interação medicamentosa por aumentar o metabolismo desses medicamentos, diminuindo seus níveis plasmáticos. Novos estudos são de grande importância para confirmar esses resultados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DOSARI, M. S.; PARVEZ, M. K. Novel plant inducers of PXR-dependent cytochrome P450 3A4 expression in HepG2 cells. **Saudi Pharm J**, v. 26, n. 8, p. 1069-1072, Dec 2018.

ALMEIDA, J. R. G. D. S. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Morus nigra* L. (AMOREIRA)**. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Morus nigra* L. (AMOREIRA): Ministério da Saúde 2015.

AMAT, A. G. Taxones de Compuestas Bonaerenses críticos para la Investigación Farmacológica. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 2, p. 23-36, 1983.

ANVISA, A. N. D. V. S.-. **O que devemos saber sobre medicamentos** 2019 2010a.

_____. **RESOLUÇÃO-RDC No- 14** 2010b.

_____. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA -RDC N°26** 2014.

ASSIRI, K. et al. Hypericum perforatum (St. John's Wort) as a possible therapeutic alternative for the management of trigeminal neuralgia (TN) - A case report. **Complement Ther Med**, v. 30, p. 36-39, Feb 2017.

AWORTWE, C. et al. Echinacea purpurea up-regulates CYP1A2, CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of pregnane X receptor pathway. **Xenobiotica**, v. 45, n. 3, p. 218-29, Mar 2015.

BANERJEE, M.; CHEN, T. Thiazide-like diuretic drug metolazone activates human pregnane X receptor to induce cytochrome 3A4 and multidrug-resistance protein 1. **Biochem Pharmacol**, v. 92, n. 2, p. 389-402, 2014.

BARTONKOVA, I.; DVORAK, Z. Essential oils of culinary herbs and spices activate PXR and induce CYP3A4 in human intestinal and hepatic in vitro models. **Toxicol Lett**, v. 296, p. 1-9, Oct 15 2018.

BECIC, F.; KAPIC, E.; BECIC, E. [Glimepiride--an oral antidiabetic agent]. **Med Arh**, v. 57, n. 2, p. 125-7, 2003.

BERKHOUT, T. A. et al. The novel cholesterol-lowering drug SR-12813 inhibits cholesterol synthesis via an increased degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 24, p. 14376-82, Jun 14 1996.

BIBIANA ORTEGA-DOMÍNGUEZ, M. H.-R. Y. A. C. T.-C. RECEPTORES NUCLEARES: DEL NÚCLEO AL CITOPLASMA. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 18, p. 131-143, 11 de septiembre 2015.

BIGLAN, K. M. et al. A novel design of a Phase III trial of isradipine in early Parkinson disease (STEADY-PD III). **Ann Clin Transl Neurol**, v. 4, n. 6, p. 360-368, 2017.

BII, C. C.; SIBOE, G. M.; MIBEY, R. K. Plant essential oils with promising antifungal activity. **East Afr Med J**, v. 77, n. 6, p. 319-22, Jun 2000.

BUCHMAN, C. D.; CHAI, S. C.; CHEN, T. A current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 14, n. 6, p. 635-647, Jun 2018.

BURRIS, T. P.; BUSBY, S. A.; GRIFFIN, P. R. Targeting Orphan Nuclear Receptors for Treatment of Metabolic Diseases and Autoimmunity. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 1, p. 51-59, 2012.

BURRIS, T. P. et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 2, p. 710-78, Apr 2013.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARNAHAN, V. E.; REDINBO, M. R. Structure and function of the human nuclear xenobiotic receptor PXR. **Curr Drug Metab**, v. 6, n. 4, p. 357-67, Aug 2005.

CHAI, S. C. et al. Small-molecule modulators of PXR and CAR. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1859, n. 9, p. 1141-1154, 2016.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 3, p. 798-802, Mar 2010.

CLAYTONJ_MOTC. *Morus nigra*: iNaturalist.org 2018.

COMMITTEE, N. R. N. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 1999. 1999/04/29, Apr 16. p.161-3.

DAGAWAL, M. J.; GHORPADE, D. S. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AN ETHNOMEDICINAL PLANT BIDENS PILOSA L **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 8, p. 2237-2238, 2011.

DANIELSON, P. B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Curr Drug Metab**, v. 3, n. 6, p. 561-97, Dec 2002.

DASH, A.; TYAGI, R. A Compendium of Nuclear Receptors: The Superfamily of Ligand-Modulated Transcription Factors. v. 20, p. 149-176, 2016.

DE SMET, P. A. Health risks of herbal remedies. **Drug Saf**, v. 13, n. 2, p. 81-93, Aug 1995.

DE WET, J. R. et al. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. **Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 725-37, Feb 1987.

DI MASI, A. et al. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. **Mol Aspects Med**, v. 30, n. 5, p. 297-343, Oct 2009.

DING, X.; STAUDINGER, J. L. Induction of drug metabolism by forskolin: the role of the pregnane X receptor and the protein kinase a signal transduction pathway. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 312, n. 2, p. 849-56, Feb 2005.

DROCOURT, L. et al. Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes. **Drug Metab Dispos**, v. 29, n. 10, p. 1325-31, Oct 2001.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 177-177, 2014.

ENG, Q. Y.; THANIKACHALAM, P. V.; RAMAMURTHY, S. Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. **J Ethnopharmacol**, v. 210, p. 296-310, Jan 10 2018.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, n. 4854, p. 889-95, May 13 1988.

FANG, P. et al. Functional assessment of CYP3A4 allelic variants on lidocaine metabolism in vitro. **Drug Des Devel Ther**, v. 11, p. 3503-3510, 2017.

FOTSO, A. F. et al. Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae). **Inflammopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 105-114, April 01 2014.

FRANCIS, G. A. et al. Nuclear receptors and the control of metabolism. **Annu Rev Physiol**, v. 65, p. 261-311, 2003.

FRANZOTTI, E. M. **Identificação de Agonistas e Antagonistas dos Receptores Nucleares em Extratos de plantas medicinais: *Morus nigra L.*, *Plectranthus ornatus***

Codd, Ipomoea cairica (L) Sweet e Pouteria torta (Mart.) Radlk. 2006. 150 p. Tese de Doutorado Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília-UnB

FROMM, M. F. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 8, p. 423-429, 2004/08/01/ 2004.

GALEOTTI, N. Hypericum perforatum (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. **J Ethnopharmacol**, v. 200, p. 136-146, Mar 22 2017.

GALLI, E.; FEIJOO, L. CITOCROMO P-450 Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA REVISIÓN ACTUALIZADA. **Revista de Neuro-Psiquiatría** v. 65, p. 187-201, 2002.

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 Sci**, v. 78, n. 8, p. 856-61, Jan 18 2006.

GEICK, A.; EICHELBAUM, M.; BURK, O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. **J Biol Chem**, v. 276, n. 18, p. 14581-7, May 4 2001.

GEISSBERGER, P.; SEQUIN, U. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? **Acta Trop**, v. 48, n. 4, p. 251-61, Feb 1991.

GLOVER, D. J.; LIPPS, H. J.; JANS, D. A. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 4, p. 299-310, Apr 2005.

GOLDEN, E. B. et al. Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. **Blood**, v. 113, n. 23, p. 5927-37, Jun 4 2009.

GOODWIN, B.; HODGSON, E.; LIDDLE, C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 6, p. 1329-39, Dec 1999.

GREWAL, G. K. et al. Exploring the Carbamazepine Interaction with Human Pregnane X Receptor and Effect on ABCC2 Using in Vitro and in Silico Approach. **Pharm Res**, v. 34, n. 7, p. 1444-1458, Jul 2017.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. **Aaps j**, v. 8, n. 1, p. E101-11, Mar 10 2006.

GUPTA, D. et al. Expanding the roles for pregnane X receptor in cancer: proliferation and drug resistance in ovarian cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 17, p. 5332-40, Sep 1 2008.

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **J Mol Biol**, v. 166, n. 4, p. 557-80, Jun 5 1983.

HASSANALILOU, T. et al. The protective effects of Morus nigra L. leaves on the kidney function tests and histological structures in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedical research**, v. 28, n. 14, p. 6113-6118, 2017.

HOGLE, B. C. et al. PXR as a mediator of herb-drug interaction. **J Food Drug Anal**, v. 26, n. 2s, p. S26-s31, Apr 2018.

HUANG, J. et al. Systematic Prediction of Pharmacodynamic Drug-Drug Interactions through Protein-Protein-Interaction Network. **PLOS Computational Biology**, v. 9, n. 3, p. e1002998, 2013.

IGMAR. *Tagetes minuta*. [HTTPS://STATIC.IN...AL.JPG?1524176156](https://static.inaturalist.org/photos/1524176156): iNaturalist.org 2016.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23-8, Nov 30 1990.

ISO, I. O. F. S.-. **Biological evaluation of devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**: 34 p. 2009.

JAKHAR, S.; DAHIYA, P. Antimicrobial, Antioxidant and Phytochemical Potential of Alternanthera pungens HB&K. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 8, p. 1255-1405, 2017.

JOEY. *Bidens pilosa L.*: iNaturalist.org 2019.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A. *Bryophyllum pinnatum (Lam.) Kurz*: Phytochemical and pharmacological profile : A review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, n. 6, p. 364-374, July 1, 2009 2009.

KAMBOJ, V. P. Herbal medicine. **Current Science**, v. 78, n. 1, p. 35-39, 2000.

KANNO, Y. et al. Nigramide C is a natural agonist of human pregnane x receptor. **Drug Metab Dispos**, v. 42, n. 6, p. 1084-9, Jun 2014.

KANNO, Y. et al. Alisol B 23-acetate from the rhizomes of Alisma orientale is a natural agonist of the human pregnane X receptor. **Phytomedicine**, v. 26, p. 22-27, Mar 15 2017.

KHATTAK, K. F.; RAHMAN, T. R. Effect of geographical distributions on the nutrient composition, phytochemical profile and antioxidant activity of *Morus nigra*. **Pak J Pharm Sci**, v. 28, n. 5, p. 1671-8, Sep 2015.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. **Anal Bioanal Chem**, v. 397, n. 8, p. 3173-8, Aug 2010.

KOTA, B. P. et al. Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells. **Pharmacol Res**, v. 62, n. 5, p. 426-31, Nov 2010.

KULBIS, A. *Matricaria chamomilla L.*: iNaturalist.org 2017

KUMAR, V. R.; CHAUHAN, S. Mulberry: Life enhancer. v. 2, p. 271-278, 2008.

KUMUD, U. et al. Comparative phytochemistry and pharmacological evaluation of *Tagetes minuta*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 6, p. 1434-1437, 2010.

LAU, A. J. et al. Human pregnane X receptor agonism by Ginkgo biloba extract: assessment of the role of individual ginkgolides. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 335, n. 3, p. 771-80, Dec 2010.

LEHMANN, J. M. et al. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. **J Clin Invest**, v. 102, n. 5, p. 1016-23, Sep 1 1998.

LI, T.; CHIANG, J. Y. Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene transcription. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, n. 1, p. G74-84, Jan 2005.

LIU, S.; DOWNES, M.; EVANS, R. M. Metabolic Regulation by Nuclear Receptors. 2015. Tokyo. Springer Japan. p.25-37.

LU, W. I.; LU, D. P. Impact of chinese herbal medicine on american society and health care system: perspective and concern. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2014, p. 251891-251891, 2014.

LUTZ, J. D. et al. Cytochrome P450 3A Induction Predicts P-glycoprotein Induction; Part 1: Establishing Induction Relationships Using Ascending Dose Rifampin. **Clin Pharmacol Ther**, Mar 23 2018.

MA, X.; CHEN, J.; TIAN, Y. Pregnane X receptor as the "sensor and effector" in regulating epigenome. **J Cell Physiol**, v. 230, n. 4, p. 752-7, Apr 2015.

MA, X.; IDLE, J. R.; GONZALEZ, F. J. The pregnane X receptor: from bench to bedside. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 4, n. 7, p. 895-908, 2008.

MALLHI, T. et al. **Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of Morus nigra against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice.** 2014. 60-66

MAMINDLA, S.; K.V.S.R.G, P.; KOGANTI, B. HERB-DRUG INTERACTIONS: AN OVERVIEW OF MECHANISMS AND CLINICAL ASPECTS. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, p. 3576-86, 01 September 2016 2016.

MANGELSDORF, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-9, Dec 15 1995.

MASUYAMA, H. et al. The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. **Mol Cell Endocrinol**, v. 172, n. 1-2, p. 47-56, Feb 14 2001.

MATHEW, S. et al. A Comprehensive Analysis and Prediction of Sub-Cellular Localization of Human Nuclear Receptors. v. 5, 2018.

MAZZARI, A. L. D. A. **In vitro effects of selected medicinal plants shortlisted for clinical use in the Brazilian public health system in CYP3A4 mRNA gene expression, glutathione levels and P-Glycoprotein activity and their implications for herb-drug interactions.** 2017. 339 Doutorate in Pharmacognosy School of Pharmacy, University of London, United Kingdom. 2017.

.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytother Res**, v. 20, n. 7, p. 519-30, Jul 2006.

MITTAL, B. et al. Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. **Adv Clin Chem**, v. 71, p. 77-139, 2015.

MOOIMAN, K. D. et al. Milk thistle's active components silybin and isosilybin: novel inhibitors of PXR-mediated CYP3A4 induction. **Drug Metab Dispos**, v. 41, n. 8, p. 1494-504, Aug 2013.

MOORE, L. B. et al. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7500-7502, 06/13

04/06/received 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MS, M. D. S.-. Plantas medicinais e fitoterápicos no SUS 2018a. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnpmf/plantas-medicinais-e-fitoterapicos-no-sus>>. Acesso em: 28 may.

_____. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME. ESTRATÉGICOS**, D. D. A. F. E. I.: Editora do Ministério da Saúde: 219 p. 2018b.

MU, Y. et al. Traditional Chinese medicines Wu Wei Zi (*Schisandra chinensis* Baill) and Gan Cao (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) activate pregnane X receptor and increase warfarin clearance in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 316, n. 3, p. 1369-77, Mar 2006.

NADERI, G. A. et al. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytother Res**, v. 18, n. 5, p. 365-9, May 2004.

NAGY, M. HISTORY OF PHYTOTHERAPY AND PHARMACOGNOSY. p. 13, [s.d.]. Disponível em: <https://www.chem.uwec.edu/chem491_w01/%20Pharmacognosy%20491/%20%20%20%20%20Med%20Chem%20Lectures/Lecture%20%206/HistoryofPharmacognosy.pdf>.

NALLANI, S. C. et al. Dose-dependent induction of cytochrome P450 (CYP) 3A4 and activation of pregnane X receptor by topiramate. **Epilepsia**, v. 44, n. 12, p. 1521-8, Dec 2003.

NARAYANAN, B. et al. Probing Ligand Structure-Activity Relationships in Pregnane X Receptor (PXR): Efavirenz and 8-Hydroxyefavirenz Exhibit Divergence in Activation. **ChemMedChem**, v. 13, n. 7, p. 736-747, Apr 6 2018.

NENCINI, C. et al. Hepatotoxicity of *Teucrium chamaedrys* L. decoction: role of difference in the harvesting area and preparation method. **Indian J Pharmacol**, v. 46, n. 2, p. 181-4, Mar-Apr 2014.

NIRALI, J.; SHANKAR, M. B. Global Market Analysis of Herbal Drug Formulations. v. 4, n. 1, p. 59-65, Jan 2016.

NOVEMBERSYY. *Matricaria chamomilla* L.: iNaturalist.org 2017

OGG, M. S. et al. A reporter gene assay to assess the molecular mechanisms of xenobiotic-dependent induction of the human CYP3A4 gene in vitro. **Xenobiotica**, v. 29, n. 3, p. 269-79, Mar 1999.

OJEWOLE, J. A. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. **J Ethnopharmacol**, v. 99, n. 1, p. 13-9, May 13 2005.

OLADIMEJI, P. O.; CHEN, T. PXR: More Than Just a Master Xenobiotic Receptor. **Mol Pharmacol**, v. 93, n. 2, p. 119-127, Feb 2018.

ORANS, J.; TEOTICO, D. G.; REDINBO, M. R. The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: recent insights and new challenges. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 12, p. 2891-900, Dec 2005.

PARVEZ, M. K.; RISHI, V. Herb-Drug Interactions and Hepatotoxicity. **Curr Drug Metab**, Mar 25 2019.

PASCUSSI, J. M. et al. Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor- α expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. **Mol Pharmacol**, v. 58, n. 2, p. 361-72, Aug 2000.

PAVEK, P. Pregnane X Receptor (PXR)-Mediated Gene Repression and Cross-Talk of PXR with Other Nuclear Receptors via Coactivator Interactions. **Front Pharmacol**, v. 7, p. 456, 2016.

PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAELS, B. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 486-504, 2012.

PERHARIC-WALTON, L.; MURRAY, V. Toxicity of Chinese herbal remedies. **Lancet**, v. 340, n. 8820, p. 674, Sep 12 1992.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, Jan-Jun 2012.

PIERRE, S.; CROSBIE, L.; DUTTARROY, A. K. Inhibitory effect of aqueous extracts of some herbs on human platelet aggregation in vitro. **Platelets**, v. 16, n. 8, p. 469-73, Dec 2005.

PIOTTER, S. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken: iNaturalist.org 2018.

PRAKASH, C. et al. Nuclear Receptors in Drug Metabolism, Drug Response and Drug Interactions. **Nucl Receptor Res**, v. 2, 2015.

QIAO, E. et al. Expression of the PXR gene in various types of cancer and drug resistance. **Oncology letters**, v. 5, n. 4, p. 1093-1100, 2013.

RATAJEWSKI, M. et al. Screening of a chemical library reveals novel PXR-activating pharmacologic compounds. **Toxicol Lett**, v. 232, n. 1, p. 193-202, Jan 05 2015.

REPÚBLICA, P. D. **LEI N° 9.782, DE 26 DE JANEIRO DE 1999**. 1999.

_____. **DECRETO N° 5.813. JURÍDICOS**, C. C.-S. P. A. Brasília 2006.

RIGALLI, J. P. et al. The pregnane X receptor (PXR) and the nuclear receptor corepressor 2 (NCoR2) modulate cell growth in head and neck squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0193242, 2018.

RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale Farmacologia**. 8. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 784 ISBN 9788535283433.

ROSETTE, C. et al. Rifamycin SV exhibits strong anti-inflammatory in vitro activity through pregnane X receptor stimulation and NFκB inhibition. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 34, n. 3, p. 172-180, 2019/06/01/ 2019.

SANCHEZ-SALCEDO, E. M. et al. (Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC-MS approach. **Food Chem**, v. 212, p. 250-5, Dec 1 2016.

SANTOS, N. C. **AVALIAÇÃO DA AÇÃO AGONISTA NO RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR) DE DROGAS VEGETAIS CONSTANTES NA RDC 10/10DA ANVISA 2012**. 81 Tese de Mestrado Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília-UnB

SARRIS, J. et al. Kava in the treatment of generalized anxiety disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **J Clin Psychopharmacol**, v. 33, n. 5, p. 643-8, Oct 2013.

SAÚDE, M. D. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. SAÚDE, S. D. P. D. Brasília: Ministério da Saúde
38 p. 2001.

_____. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. CIÊNCIA, S. D.;ESTRATÉGICO, T. E. I., et al. Brasília: MINISTÉRIO DA SAÚDE

1* edição: 60 p. 2006.

_____. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. SAÚDE, A. Brasília 2009.

_____. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Bidens pilosa* (Picão -preto)**. ANVISA, A. N. D. V. S.-. Brasília: 73 p. 2015a.

_____. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Matricaria chamomilla* (= *Chamomilla recutita*(L.) *Rauschert*, CAMOMILA)**. ANVISA, A. N. D. V. S.-. 219 p. 2015b.

_____. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Morusnigra*L. (AMOREIRA)**. ANVISA, A. N. D. V. S.-. Brasília: 68 p. 2015c.

_____. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *TAGETES MINUTA* L. (CRAVO-DE-DEFUNTO)**. ANVISA, A. N. D. V. S.-. 2015d.

SCHEER, N. et al. In vivo responses of the human and murine pregnane X receptor to dexamethasone in mice. **Drug Metab Dispos**, v. 38, n. 7, p. 1046-53, Jul 2010.

SENATORE, F. et al. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, n. 6, p. 574-578, 2004.

SHARIFI, F. et al. Comparison of the effects of *Matricaria chamomila* (Chamomile) extract and mefenamic acid on the intensity of premenstrual syndrome. **Complement Ther Clin Pract**, v. 20, n. 1, p. 81-8, Feb 2014.

SHUKLA, S. J. et al. Identification of clinically used drugs that activate pregnane X receptors. **Drug Metab Dispos**, v. 39, n. 1, p. 151-9, Jan 2011.

SILVA, S. **EFEITO DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS NA ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO RECEPTOR PREGNANO X EM CÉLULAS HELA**. 2019. 88 Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília-UnB

SIMPSON, W. J.; SMITH, A. R. Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. **J Appl Bacteriol**, v. 72, n. 4, p. 327-34, Apr 1992.

SINZ, M. et al. Evaluation of 170 xenobiotics as transactivators of human pregnane X receptor (hPXR) and correlation to known CYP3A4 drug interactions. **Curr Drug Metab**, v. 7, n. 4, p. 375-88, May 2006.

SINZ, M. W. Evaluation of pregnane X receptor (PXR)-mediated CYP3A4 drug-drug interactions in drug development. **Drug Metab Rev**, v. 45, n. 1, p. 3-14, Feb 2013.

SMUTNY, T.; PAVEK, P. Resveratrol as an Inhibitor of Pregnane X Receptor (PXR): Another Lesson in PXR Antagonism. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 126, n. 2, p. 177-178, 2014.

SOBOTA, J. D. F.; PINHO, M. G.; OLIVEIRA, V. B. Perfil Físico-Químico e Atividade Antioxidante do Cálice da Espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a Partir do Extrato Aquoso e Alcoólico Obtidos por Infusão e Decocto. **Revista Fitos** v. 10, n. Fundação Oswaldo Cruz. Farmanguinhos. Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde., 2016.

SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R. M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. **FEBS Lett**, v. 582, n. 1, p. 2-9, Jan 9 2008.

STAUDINGER, J. L.; DING, X.; LICHTI, K. Pregnane X receptor and natural products: beyond drug-drug interactions. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 2, n. 6, p. 847-57, Dec 2006.

SUNNETCHAN. *Bidens pilosa*: iNaturalist.org 2019

SYLVESTER, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Methods Mol Biol**, v. 716, p. 157-68, 2011.

TAG, H. M. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. 252-252, 2015.

TEOTICO, D. G. et al. Structural basis of human pregnane X receptor activation by the hops constituent colupulone. **Mol Pharmacol**, v. 74, n. 6, p. 1512-20, Dec 2008.

TEOTICO, D. G. et al. Structural basis of human pregnane X receptor activation by the hops constituent colupulone. **Molecular pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 1512-1520, 2008.

TERESCHUK, M. A. L. et al. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 3, p. 227-232, 1997/05/01/1997.

THEMBO, K. M. et al. Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. **J Appl Microbiol**, v. 109, n. 4, p. 1479-86, Oct 2010.

TINDLE, H. A. et al. Trends in use of complementary and alternative medicine by US adults: 1997-2002. **Altern Ther Health Med**, v. 11, n. 1, p. 42-9, Jan-Feb 2005.

UMESONO, K.; EVANS, R. M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. **Cell**, v. 57, n. 7, p. 1139-46, Jun 30 1989.

VENKATARAMANAN, R.; KOMOROSKI, B.; STROM, S. In vitro and in vivo assessment of herb drug interactions. **Life Sci**, v. 78, n. 18, p. 2105-15, Mar 27 2006.

WANG, H.; LECLUYSE, E. L. Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. **Clin Pharmacokinet**, v. 42, n. 15, p. 1331-57, 2003.

WANG, J. et al. Biology of PXR: role in drug-hormone interactions. **Excli j**, v. 13, p. 728-39, 2014.

WANG, S. et al. Hop (*Humulus lupulus* L.) Extract and 6-Prenylnaringenin Induce P450 1A1 Catalyzed Estrogen 2-Hydroxylation. **Chem Res Toxicol**, v. 29, n. 7, p. 1142-50, Jul 18 2016.

WANG, X. et al. Chapter 24 - Identification of the Absorbed Constituents of Schisandra Lignans by Serum Pharmacochemistry of TCM. In: (Ed.). **Serum Pharmacochemistry of Traditional Chinese Medicine**: Academic Press, 2017. p.337-350. ISBN 978-0-12-811147-5.

WANG, Y. M. et al. Piperine activates human pregnane X receptor to induce the expression of cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 272, n. 1, p. 96-107, Oct 1 2013.

WATKINS, R. E. et al. 2.1 A crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. **Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1430-8, Feb 18 2003.

WATKINS, R. E. et al. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. **Science**, v. 292, n. 5525, p. 2329-33, Jun 22 2001.

WEIDNER, C. et al. Antidiabetic effects of chamomile flowers extract in obese mice through transcriptional stimulation of nutrient sensors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80335-e80335, 2013.

WERK, A. N.; CASCORBI, I. Functional gene variants of CYP3A4. **Clin Pharmacol Ther**, v. 96, n. 3, p. 340-8, Sep 2014.

WHO, W. H. O.-. **Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review.** Geneva 1998.

_____. **Traditional Medicine Strategy 2002 – 2005.** Geneva: WHO 2002.

_____. **WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems** Geneva: 82 p. 2004.

YADAV, M.; GULKARI, V.; WANJARI, M. *Bryophyllum pinnatum* leaf extracts prevent formation of renal calculi in lithiatic rats. **Ancient Science of Life**, v. 36, n. 2, p. 90-97, October 1, 2016 2016.

YANG, X.-X. et al. Drug-Herb Interactions: Eliminating Toxicity with Hard Drug Design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 35, p. 4649-4664, // 2006.

YEUNG, E. Y. et al. Identification of Ginkgo biloba as a novel activator of pregnane X receptor. **Drug Metab Dispos**, v. 36, n. 11, p. 2270-6, Nov 2008.

ZHANG, Y. et al. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. **Acta Pharmacol Sin**, v. 36, n. 1, p. 71-87, Jan 2015.

ZHI, X. et al. Structures and regulation of non-X orphan nuclear receptors: A retinoid hypothesis. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 157, p. 27-40, Mar 2016.

ZHU, Z. et al. Use of Cryopreserved Transiently Transfected Cells in High-Throughput Pregnane X Receptor Transactivation Assay. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 12, n. 2, p. 248-254, 2007.