

Elaine Maria Franzotti

**IDENTIFICAÇÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DE
RECEPTORES NUCLEARES EM EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS: MORUS NIGRA L., PLECTRANTHUS
ORNATUS CODD., IPOMOEA CAIRICA (L) SWEET E
POUTERIA TORTA (MART.) RADLK**

Brasília - 2006

Elaine Maria Franzotti

**IDENTIFICAÇÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DE
RECEPTORES NUCLEARES EM EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS: MORUS NIGRA L., PLECTRANTHUS
ORNATUS CODD., IPOMOEA CAIRICA (L) SWEET E
POUTERIA TORTA (MART.) RADLK**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de
Brasília para obtenção do Título de
Doutor em Ciências da Saúde**

Orientador: PROF. DR. LUIZ ALBERTO SIMEONI

2006

**Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular da
Faculdade de Ciências da Saúde com apoio financeiro da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**

Orientador: PROF. DR. LUIZ ALBERTO SIMEONI

Dedico esse trabalho ao Prof. Ralff Ribeiro (*in memoriam*),
Ao Laureano e aos meus filhos
Tiago e Camila.

É bom olhar para trás
e admirar a vida que soubemos fazer.
É bom olhar para frente.
É bom, nunca é igual
olhar, beijar e ouvir cantar
o novo dia nascendo.
É bom e é tão diferente.

(Nando Reis)

Agradecimentos

Ao Professor Ralff Ribeiro (*in memorian*), mentor desse projeto.

Aos meus filhos Tiago e Camila, grande alegria da minha vida.

Ao Laureano, que sempre me incentivou a superar meus limites.

Aos meus pais e meu irmão Celso, que, com dedicação, sempre me deram apoio para continuar seguindo o caminho.

Meu agradecimento ao Professor Luiz Alberto Simeoni pela orientação.

À professora Dâmaris e ao Professor Francisco Neves, que tiveram participação fundamental nessa tese. Obrigada pela grande ajuda.

Ao professor Ângelo Antonioli que despertou em mim o interesse pela pesquisa. Muito obrigada pelos ensinamentos, pelo exemplo de profissionalismo e pela amizade

À Sâmia, companheira de muitos resultados nesse trabalho.

Aos amigos das horas certas e principalmente das horas incertas: Adriana, Alessandra, Cristina, Daniela, Fanny, Gustavo, Lara, Marlon, Rilva, Rut, Rani, Tiago e a todo o pessoal do Pibic.

Aos amigos: Sandro, Clarissa e Marta. Obrigada pelo incentivo e pela amizade.

Ao Professor Délio Raslan, aos doutorandos Patrícia e Alexandre e ao aluno de Farmácia João Perfeito por terem cedido os extratos e substâncias isoladas dos extratos utilizados nesse trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Resumo

A utilização de plantas com fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Produtos naturais, incluindo derivados de plantas, têm contribuído grandemente para o desenvolvimento de modernos fármacos. O Brasil possui uma grande tradição no uso de plantas com fins terapêuticos, com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. O principal objetivo dos estudos aqui apresentados foi o de aumentar o conhecimento científico sobre a ação de espécies vegetais de nossa flora utilizadas com finalidade terapêutica. Essas informações pretendem contribuir, não somente para o descobrimento de novos ligantes para receptores nucleares, como também para o descobrimento de novos fármacos que tenham sua ação modulada pelos receptores de estrogênio e de glicocorticóide. As espécies aqui estudadas, *Morus nigra*, *Pouteria torta*, *Plectranthus ornatus* e *Ipomoea cairica* têm uso comum na medicina popular do Brasil e suas ações ainda não são adequadamente conhecidas em receptores nucleares. Utilizando-se ensaio de gene repórter e transfecção em cultura de células U937, foram pesquisadas as ações de extratos e de substâncias isoladas das espécies já citadas nos receptores de estrogênios (ER α e ER β) e de glicocorticóide (GR). Nas condições experimentais o extrato etanólico de *Morus nigra* apresentou toxicidade para as células U937; os extratos aquoso e o hexânico não apresentaram ação agonista ou antagonista em ER α e ER β . O extrato hexânico de *Pouteria torta* apresentou atividade antagonista (não competitiva) em ER β e nenhuma atividade em ER α . O extrato etanólico de *Ipomoea cairica* apresentou efeito antagonista em ER α e nenhuma ação sobre o ER β . Com relação aos fitoconstituintes de *Ipomoea cairica*, o glicosídeo de arctigenina, o glicosídeo de traquelogenina, o ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico e o ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico ativaram a transcrição do ER α . Essa ativação foi menor do que a ativação promovida pelo estradiol. O glicosídeo de traquelogenina e o ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico, na presença de estradiol, intensificaram a atividade transcricional do ER β . O extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* aumentou a atividade transcricional do GR com intensidade igual à da dexametasona. Quando adicionados conjuntamente, o extrato hexânico de *P. ornatus* e dexametasona, a atividade transcricional do GR foi intensificada. Os diterpenos ácido 11*R**-acetoxiclavênico, 1 α ,6 β ,7 β -triacetoxi-8,13*R**-epoxi-14-labden-11-ona e 1 α ,6 β ,7 β -triacetoxi-9-hidroxi-8,13*R**-epoxi-14-labden-11-ona, isolados do extrato hexânico de *P. ornatus*, não tiveram qualquer ação sobre o receptor do GR.

Abstract

The use of plants for treatment and prevention of diseases is one of the oldest medicinal practices. However, for several of these plants, few or none scientific evidence of their pharmacological properties are known. Natural products, including plant derivatives, have contributed to the development of new drugs. The aim of this study is to evaluate four species widely used in Brazilian folk medicine, *Morus nigra*, *Pouteria torta*, *Plectranthus ornatus*, and *Ipomoea cairica*, in relation to their activities on estrogen (ER α and ER β) and glucocorticoid (GR) receptors. In the experimental conditions the ethanol extract of *Morus nigra* showed to be toxic for the U937 cells, the aqueous and hexane extracts did not present either an agonist or an antagonist action on ER α and ER β . The hexane extract of *Pouteria torta* presented non-competitive antagonist activity on ER β and no action on ER α . *Ipomoea cairica* hexane extract showed an antagonist effect on ER α and no action on ER β . The compounds isolated from *Ipomoea cairica*, arctigenin glucoside, trachelogenin glucoside, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid and 4,5-di-O-caffeoylquinic acid activated the transcription of ER α . This activation was lower than the activation obtained with estradiol. The trachelogenin glucoside and the 4,5-di-O-caffeoylquinic acid, in presence of estradiol, enhanced the ER β transcriptional activity. The hexane extract of *Plectranthus ornatus* increased the GR transcriptional activity as well as dexametasone. When were together, the hexane extract of *Plectranthus ornatus* and dexametasone, the GR transcriptional activity was enhanced. Diterpenes 11*R**-acetoxykolavenic acid, 1 α ,6 β ,7 β -triacetoxy-8,13*R**-epoxy-14-labden-11-one, 1 α ,6 β ,7 β -triacetoxy-9-hydroxy-8,13*R**-epoxy-14-labden-11-one, isolated from the hexane extract of *P. ornatus* did not showed effects on the GR receptor.

Abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| AAq | Extrato aquoso de <i>Morus nigra</i> |
| AEtOH | Extrato etanólico de <i>Morus nigra</i> |
| AF-1 | Função de ativação 1 |
| AF-2 | Função de ativação 2 |
| AH | Extrato hexânico de <i>Morus nigra</i> |
| AR | Receptor de androgênios |
| CC | Cromatografia de coluna |
| CG | Cromatografia gasosa |
| CMV | Citomegalovírus |
| CoA | Co-ativador |
| CoR | Co-repressor |
| COX-1 | Ciclooxigenase |
| DBD | Domínio de ligação ao DNA |
| Dex | Dexametasona |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| E ₂ | Estradiol |
| ER | Receptor de estrogênio |
| ERE | Elemento responsivo do receptor de estrogênio |
| FSH | Hormônios Folículo-Estimulante |
| FT | Fator transcricional |
| FXR | Receptor dos farnesóides |
| Gal | β -Galactosidase |
| GC | Glicocorticóide |
| GLC | Cromatografia gás-líquido |
| GR | Receptor de glicocorticóide |
| GRE | Elemento responsivo do receptor de glicocorticóide |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HRE | Elemento responsivo hormonal |
| HSP | Proteína de choque térmico |
| IR | Espectroscopia de absorção no infravermelho |
| ICEtOH | Extrato etanólico de <i>Ipomoea cairica</i> |

| | |
|-------------------|--|
| KCR | Reação colorimétrica de Kober |
| LBD | Domínio de ligação ao ligante |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| Luc | Luciferase |
| MR | Receptor mineralocorticóide |
| MS | Espectrometria de massa |
| NH ₂ t | Amino-terminal |
| NLS | Sinal de localização nuclear |
| NMR | Ressonância Magnética Nuclear |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| POH | Extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> |
| POEtOH | Extrato etanólico de <i>Plectranthus ornatus</i> |
| PPAR | Receptor dos proliferadores peroxissomais |
| PR | Receptor de progesterona |
| PTAq | Extrato aquoso de <i>Pouteria torta</i> |
| PTEtOH | Extrato etanólico de <i>Pouteria torta</i> |
| PTH | Extrato hexânico de <i>Pouteria torta</i> |
| PXR | Receptor dos pregnanos |
| RAR | Receptor do ácido retinóico |
| RIA | Radioimunoensaio |
| RN | Receptor Nuclear |
| RSV | Rous sarcoma vírus |
| RXR | Receptor do ácido <i>cis</i> -9-retinóico |
| SXR | Receptor de esteróide e xenobiótico |
| tk | Timidina quinase |
| TLC | Cromatografia de camada fina |
| TR | Receptor dos hormônios tireoideanos |
| TRH | Terapia de reposição hormonal |
| U937 | Células pró-monocíticas humanas |
| UV | Ultra-violeta |
| VDR | Receptor da vitamina D |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Sinalização Celular..... | 1 |
| 1.2. Receptores Nucleares..... | 2 |
| 1.3. Estrutura Geral dos Receptores Nucleares..... | 4 |
| 1.4. Mecanismo de Ação dos Receptores Nucleares..... | 6 |
| 1.5. Receptores como Alvos Farmacológicos..... | 8 |
| 1.5.1. Receptor do Estrogênio (ER)..... | 11 |
| 1.5.2. Receptor do Glicocorticóide (GR)..... | 15 |
| 1.6. Plantas Medicinais..... | 19 |
| 1.7. Ação de Substâncias de Origem Vegetal em Receptores Nucleares..... | 24 |
| 1.8. Espécies Estudadas..... | 29 |
| 1.8.1. <i>Morus nigra</i> L..... | 29 |
| 1.8.2. <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk..... | 31 |
| 1.8.3. <i>Plectranthus ornatus</i> Codd..... | 32 |
| 1.8.4. <i>Ipomoea cairica</i> (L.) Sweet..... | 34 |
| 2. OBJETIVOS..... | 36 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 36 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 36 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 37 |
| 3.1. Cultura de Células, Reagentes e Plasmídeos..... | 37 |
| 3.2. Transfecção e Ensaio de Gene Repórter..... | 38 |
| 3.3. Cálculo da Taxa de Ativação da Transcrição..... | 39 |
| 3.4. Análise Estatística..... | 39 |
| 3.5. Obtenção dos Extratos e Substâncias Isoladas..... | 40 |
| 3.5.1. Extratos de <i>Morus nigra</i> L..... | 40 |
| 3.5.2. Extratos de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk | 41 |
| 3.5.3. Extratos e diterpenos isolados de <i>Plectranthus ornatus</i> Codd..... | 42 |
| 3.5.4. Extrato e substâncias isolados de <i>Ipomoea cairica</i> (L.) Sweet | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 4.1. <i>Morus nigra</i> (L)..... | 45 |
| 4.1.1. Estudo do efeito tóxico dos extratos de <i>Morus nigra</i> para as células U937..... | 46 |
| 4.1.2. Estudo do efeito agonista de <i>Morus nigra</i> sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β | 47 |
| 4.1.3. Estudo do efeito antagonista de <i>Morus nigra</i> sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β | 49 |
| 4.2. <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk..... | 52 |
| 4.2.1. Estudo do efeito tóxico de <i>Pouteria torta</i> para as células U937..... | 52 |
| 4.2.2. Estudo do efeito agonista de <i>Pouteria torta</i> sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β | 53 |
| 4.2.3. Estudo do efeito antagonista de <i>Pouteria torta</i> sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β | 54 |
| 4.2.4. Estudo do efeito antagonista do extrato hexânico de <i>Pouteria torta</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER β | 56 |
| 4.3. <i>Plectranthus ornatus</i> Codd..... | 59 |
| 4.3.1. Estudo do efeito tóxico de <i>Plectranthus ornatus</i> para as células U937..... | 59 |
| 4.3.2. Estudo do efeito agonista de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo GR..... | 60 |
| 4.3.3. Estudo do efeito antagonista de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo GR..... | 61 |
| 4.3.4. Estudo do efeito agonista do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β | 63 |
| 4.3.5. Estudo do efeito antagonista do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β | 64 |
| 4.3.6. Estudo do efeito tóxico dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> para as células U937..... | 66 |
| 4.3.7. Estudo do efeito agonista dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo GR..... | 67 |
| 4.3.8. Estudo do efeito antagonista dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo GR..... | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4. <i>Ipomoea cairica</i> (L) Sweet..... | 69 |
| 4.4.1. Estudo do efeito tóxico de <i>Ipomoea cairica</i> para as células U937..... | 69 |
| 4.4.2. Estudo do efeito agonista de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada pelos receptores de estrogênio ER α e ER β | 70 |
| 4.4.3. Estudo do efeito antagonista de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada pelos receptores de estrogênio ER α e ER β | 71 |
| 4.4.4. Estudo do efeito tóxico das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> para as células U937..... | 73 |
| 4.4.5. Estudo do efeito agonista das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α | 74 |
| 4.4.6. Estudo do efeito antagonista das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α | 75 |
| 4.4.7. Estudo do efeito agonista das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER β | 76 |
| 4.4.8. Estudo do efeito antagonista das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER β | 77 |
| 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS..... | 79 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 83 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Os receptores nucleares humanos, suas isoformas, suas nomenclaturas e quando conhecidos, seus ligantes..... | 3 |
| Tabela 2. Desordens endócrinas ocorridas por mutações nos RN ligante-dependentes e local de mutação..... | 10 |
| Tabela 3. Mutações em receptores órfãos..... | 10 |
| Tabela 4. Imunolocalização, em tecidos de humanos adultos, das isoformas α e β do receptor do estrogênio (ER)..... | 13 |
| Tabela 5. Receptores de estrogênio (ER) como alvos de doenças. Tecidos alvos, receptores presentes, patologias associadas e sugestão farmacológica..... | 14 |
| Tabela 6. Resultados de análise quantitativa e qualitativa de esteróides, incluindo hormônios de mamíferos, em material vegetal..... | 26 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura primária representando os domínios funcionais dos receptores nucleares: domínio amino-terminal (NH2-t), domínio de ligação ao DNA (DBD), dobradiça (Hinge), domínio de ligação ao ligante (LBD) e suas respectivas funções..... | 4 |
| Figura 2. Segmento representativo dos dedos de zinco e das regiões P-Box e D-Box..... | 5 |
| Figura 3. Receptores nucleares em ação..... | 8 |
| Figura 4. Comparação das estruturas primárias dos ER α e ER β , respectivamente..... | 12 |
| Figura 5. Representação esquemática do mecanismo tipo 1 da ação dos hormônios glicocorticóides..... | 17 |
| Figura 6. Representação esquemática do mecanismo tipo 2 da ação dos hormônios glicocorticóides..... | 18 |
| Figura 7. Maiores ações dos glicocorticóides em mamíferos..... | 19 |
| Figura 8. Obtenção dos extratos de <i>Morus nigra</i> L..... | 40 |
| Figura 9. Obtenção dos extratos de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk..... | 41 |
| Figura 10. Obtenção dos extratos de <i>Plectranthus ornatus</i> Codd..... | 42 |
| Figura 11. Obtenção do extrato de <i>Ipomoea cairica</i> (L) Sweet..... | 43 |
| Figura 12. Efeito tóxico do extrato etanólico (AEtOH) de <i>Morus nigra</i> para as células U937..... | 46 |
| Figura 13. Curva dose-resposta do extrato etanólico de <i>Morus nigra</i> | 47 |
| Figura 14. Ausência de ação agonista dos extratos aquoso e etanólico de <i>Morus nigra</i> sobre o ER α | 48 |
| Figura 15. Ausência de ação agonista dos extratos aquoso e etanólico de <i>Morus nigra</i> sobre o ER β | 49 |
| Figura 16. Ausência de efeito antagonista dos extratos aquoso e etanólico de <i>Morus nigra</i> sobre o ER α | 50 |
| Figura 17. Ausência de efeito antagonista dos extratos aquoso e etanólico de <i>Morus nigra</i> sobre o ER β | 51 |
| Figura 18. Atoxicidade dos extratos aquoso, etanólico e hexânico de <i>Pouteria torta</i> para as células U937 | 53 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Ausência de ação agonista dos extratos de <i>Pouteria torta</i> sobre a atividade transcricional mediada por ER α e ER β | 54 |
| Figura 20. Efeito antagonista do extrato hexânico de <i>Pouteria torta</i> sobre a atividade transcricional mediada por ER β e ausência desse efeito para ER α | 56 |
| Figura 21. Efeito antagonista observado com doses crescentes do extrato hexânico de <i>Pouteria torta</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER β | 57 |
| Figura 22. Curva dose-resposta do estradiol na presença de PTH..... | 58 |
| Figura 23. Ausência de efeito tóxico dos extratos de <i>Plectranthus ornatus</i> para as células U937..... | 60 |
| Figura 24. Efeito agonista do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo GR..... | 61 |
| Figura 25. Ausência de efeito antagonista de extratos de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo GR..... | 62 |
| Figura 26. Curva dose-resposta de dexametasona no GR..... | 63 |
| Figura 27. Ausência de efeito agonista do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α e ER β | 64 |
| Figura 28. Ausência de efeito antagonista do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α e ER β | 65 |
| Figura 29. Ausência de efeito tóxico dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> para as células U937..... | 66 |
| Figura 30. Ausência de efeito agonista dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> para o GR..... | 67 |
| Figura 31. Ausência de efeito antagonista dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de <i>Plectranthus ornatus</i> para o GR..... | 68 |
| Figura 32. Ausência de efeito tóxico do extrato de <i>Ipomoea cairica</i> para as células U937..... | 70 |
| Figura 33. Ausência de efeito agonista do extrato de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada pelos receptores de estrogênio ER α e ER β | 71 |
| Figura 34. Atividade antagonista do extrato de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada por ER α e ausência desse efeito sobre o ER β | 72 |
| Figura 35. Efeito tóxico das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> para as células U937..... | 73 |

| | |
|--|----|
| Figura 36. Efeito agonista das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α | 74 |
| Figura 37. Ausência de efeito antagonista das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada por ER α | 75 |
| Figura 38. Ausência de efeito agonista das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada pelo ER β | 76 |
| Figura 39. Ausência de efeito antagonista das substâncias 29 , 28 , 31 e 30 isoladas de <i>Ipomoea cairica</i> sobre a atividade transcricional mediada por ER β | 77 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. SINALIZAÇÃO CELULAR

A comunicação entre as células é fundamental na regulação de processos metabólicos, nos controles de crescimento, de diferenciação celular e na integração fisiológica dos organismos vivos. Essa intercomunicação é realizada por intermédio de moléculas denominadas sinalizadoras ou ligantes, as quais são representadas por proteínas, pequenos peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, retinóides e gases - como óxido nítrico e monóxido de carbono (Alberts, Bray et al. 1994).

Independentemente da natureza do sinal, as células-alvo respondem por intermédio de proteínas específicas denominadas receptores. Esses são estruturas moleculares altamente especializadas que têm no organismo afinidade para interagir com substâncias endógenas com função fisiológica. Os receptores podem também reagir com substâncias exógenas que tenham características químicas e estruturais comparáveis às substâncias que ocorrem naturalmente no organismo. A ligação entre as moléculas sinalizadoras e seus receptores específicos desencadeia vários processos metabólicos de respostas específicas dentro da célula-alvo.

Os receptores se dividem em dois grupos de acordo com sua localização na célula. O primeiro grupo de receptores é constituído por proteínas do tipo transmembrana que se localizam na superfície das células-alvo. Esses receptores são ativados por ligação de uma molécula sinalizadora específica e essa ligação desencadeia, por sua vez, a geração de uma cascata de sinais intracelulares que alteram o comportamento da célula. O segundo grupo está localizado no interior das células-alvo e requer a entrada da molécula sinalizadora - no citosol ou no núcleo - para serem ativados. Os receptores que recebem o sinal no interior da célula possuem suas ações desencadeadas após a ligação do complexo receptor-ligante interagir com seqüências específicas no interior do núcleo. Assim, são eles chamados **receptores nucleares (RN)**.

Os receptores nucleares são proteínas que agem por meio da regulação da transcrição de genes-alvo mediando, desta forma, os efeitos dos hormônios nas células. Esses receptores atuam como fatores de transcrição com as seguintes características: respondem a uma grande variedade de reguladores hormonais ou sinais metabólicos de maneira direta, ou seja, por meio da associação física com os mesmos; integram várias vias

de sinalização podendo ser, eles próprios, alvos de modificação pós traducional; e regulam a atividade de outras cascatas de sinalização (normalmente referidas como transdução de sinal cruzada).

1.2. RECEPTORES NUCLEARES

A superfamília dos receptores nucleares compreende 49 genes que codificam 75 proteínas diferentes (Robinson-Rechavi, Carpentier et al. 2001). Esses receptores possuem a função de regular a transcrição de genes no interior do núcleo celular, daí o seu nome. A sua identificação em todo reino animal, desde os nematóides até o Homem, sugere uma origem comum desses receptores e demonstra que sua evolução precedeu à diferenciação entre vertebrados e invertebrados (Hodgkin 1999). Em geral, eles possuem alta conservação molecular entre espécies de vertebrados (Krasowski, Yasuda et al. 2005).

Tem sido proposto que os receptores nucleares evoluíram a partir de um receptor órfão ancestral tendo adquirido, com o tempo, a capacidade de ligação (Escriva, Safi et al. 1997).

Receptores nucleares estão amplamente envolvidos no controle de diversos processos fisiológicos e representam alvos terapêuticos para um grande número de doenças humanas incluindo câncer, doenças do coração e distúrbios endócrinos e metabólicos (Chawla, Repa et al. 2001; Kliewer, Xu et al. 2001; McDonnell, Wijayarathne et al. 2002).

A superfamília dos receptores nucleares inclui os receptores para esteróides, vitamina D, retinóides, hormônios tireoideanos e prostaglandinas, além de um grande número de receptores cujos ligantes naturais ainda não foram identificados, denominados “receptores órfãos” (Kliewer, Lehmann et al. 1999; Gronemeyer, Gustafsson et al. 2004). Os receptores nucleares humanos estão demonstrados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Os receptores nucleares humanos, suas isoformas e quando conhecidos, seus ligantes.

| Nome | Abreviatura | Ligante |
|---|------------------|--|
| Receptor dos hormônios tireoideanos | TR α | Hormônios tireoideanos |
| | TR β | Hormônios tireoideanos |
| Receptor do ácido retinóico | RAR α | Ácido retinóico |
| | RAR β | Ácido retinóico |
| | RAR γ | Ácido retinóico |
| Receptor dos proliferadores peroxissomais | PPAR α | Ácidos graxos, Leucotrieno B4 |
| | PPAR β | Ácidos graxos |
| | PPAR γ | Ácidos graxos, Prostaglandina J2 |
| Reverse erbA | Rev-erb α | Orfão |
| | Rev-erb β | Orfão |
| Receptor de ácido retinóico | RAR α | Colesterol |
| | RAR β | Ácido retinóico |
| | RAR γ | Ácido retinóico |
| Receptor hepático X | LXR α | Oxisteróis |
| | LXR β | Oxisteróis |
| Receptor da vitamina D | VDR | 1,25-diidroxi vitamina D ₃ , ácido lítocólico |
| Receptores dos pregnanos | PXR | Xenobióticos |
| Receptor constitutivo de androstano | CAR | Xenobióticos, fenobarbital |
| Fator nuclear humano 4 | HF4 α | Orfão |
| | HF4 γ | Órfão |
| Receptor do ácido retinóico | RXR α | Ácido retinóico |
| | RXR β | Ácido retinóico |
| | RXR γ | Ácido retinóico |
| Receptor de estrogênio | ER α | 17 β -estradiol, tamoxifemo, raloxifeno |
| | ER β | 17 β -estradiol, vários compostos sintéticos |
| Receptor do glicocorticóide | GR | Cortisol, dexametasona, RU485 |
| Receptor mineralocorticóide | MR | Aldosterona, espirolactona |
| Receptor da progesterona | PR | Progesterona, acetato de medroxiprogesterona, RU485 |
| Receptor de androgênio | AR | Testosterona, flutamida |
| Fator esteroideogênico 1 | SF1 | Orfão |
| Receptor testicular | TR2 | Orfão |
| | TR4 | Orfão |

Fonte: Hinrich Gronemeyer et al (2004) www.nature.com/reviews/drugdisc

1.3. ESTRUTURA GERAL DOS RECEPTORES NUCLEARES

Os receptores nucleares possuem estrutura modular com domínios funcionais distintos. Os três principais domínios são: amino-terminal (NH₂-t), de ligação ao DNA (DBD) e de ligação ao ligante (LBD). Existe também uma pequena região que conecta o DBD ao LBD, conhecida como dobradiça (*hinge*), sendo ela extremamente variável entre os diferentes receptores (Ribeiro, Apriletti et al. 1998). Cada módulo desempenha uma função específica, sendo que eles podem também interagir entre si para executar uma determinada ação biológica do receptor (**Figura 1**).

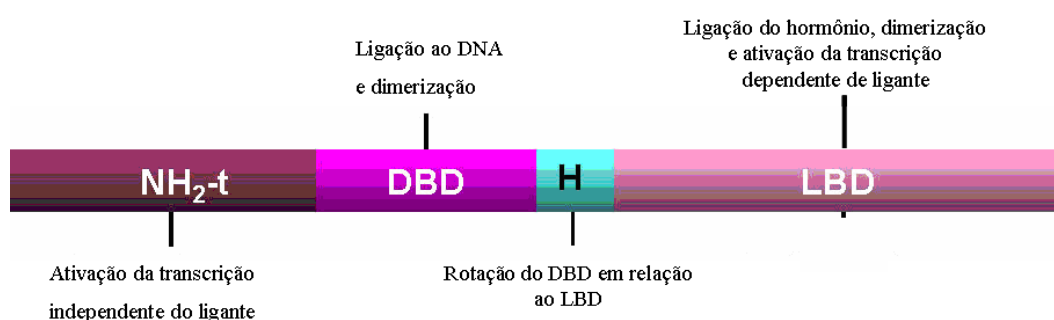


Figura 1. Estrutura primária representando os domínios funcionais dos receptores nucleares: domínio amino-terminal (NH₂-t), domínio de ligação ao DNA (DBD), dobradiça (*Hinge*), domínio de ligação ao ligante (LBD) e suas respectivas funções.

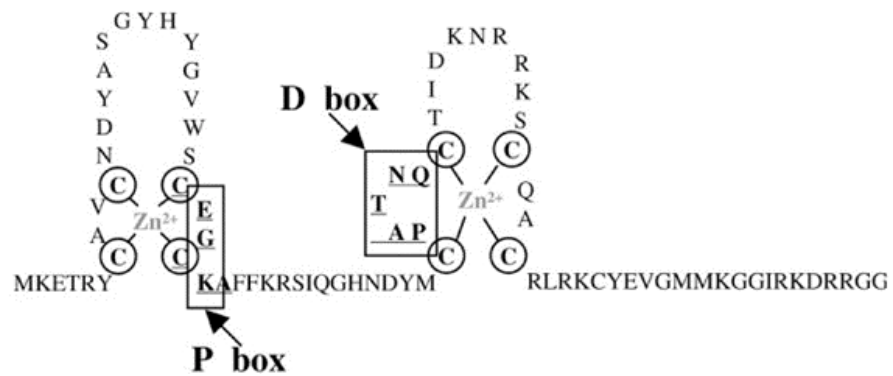
O domínio amino-terminal é extremamente variável entre os membros da superfamília dos receptores nucleares, tanto no tamanho quanto na seqüência de aminoácidos, e exibe uma função de ativação transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1) (Ribeiro, Apriletti et al. 1998; Warnmark, Treuter et al. 2003).

O DBD possui alta identidade seqüencial entre os receptores nucleares e tem como função principal a ligação ao DNA. Esse domínio está situado na porção central dos receptores e é organizado por dois segmentos estruturais conhecidos como dedos de zinco. Nesses segmentos, quatro resíduos de cisteínas de cada dedo formam complexos coordenados por íons de zinco, compondo duas estruturas independentes em forma de alça (Mangelsdorf and Evans 1995). Os dois dedos de zinco são separados por uma seqüência de 15 a 17 aminoácidos. Três aminoácidos da base do primeiro dedo de zinco representam a região chamada *P-box*, os quais são responsáveis pelo reconhecimento do elemento responsivo específico para cada receptor (Umesono and Evans 1989). Por outro lado, uma

seqüência de cinco aminoácidos, denominada *D-box* e localizada entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo, constitui uma região importante para a dimerização do receptor (Umesono and Evans 1989; Ribeiro, Apriletti et al. 1998). Os termos *P-box* e *D-box* estão relacionados com a posição proximal e distal dessas regiões, respectivamente (**Figura 2**).

A)

| Receptor | P-Box |
|-----------------|--------------|
| GR/MR/PR/AR | cGSckV |
| ER | cEGckA |
| TR/RAR/VDR/RXR | cEGckG |



B)

Figura 2. Segmento representativo dos dedos de zinco e das regiões *P-Box* e *D-Box*. **A)** A região *P-Box* é responsável pelo reconhecimento do elemento responsivo específico para cada receptor, enquanto a região *D-Box* é uma região importante para a dimerização do receptor. **B)** Variações dos aminoácidos da região *P-Box* nos diferentes receptores nucleares.

O LBD é menos conservado do que o DBD, refletindo a variedade de ligantes atuantes nesses receptores. Localizado na região carboxi-terminal, o domínio LBD possui várias funções como: a homo e heterodimerização do receptor, localização nuclear, dissociação das proteínas de choque térmico (HSPs) e interação com proteínas co-repressoras e co-ativadoras (Glass and Rosenfeld 2000; McKenna and O'Malley 2002). Além dessas funções, o LBD contém uma superfície formada pela ligação do hormônio ao receptor que é fundamental para a ativação transcricional. Após a ligação do hormônio, essa região, denominada função de ativação 2 (AF-2), passa a interagir com os co-ativadores, os quais permitirão a formação do complexo protéico envolvido na ativação da transcrição (Wu, Xu et al. 2001).

A região conhecida como dobradiça é responsável pela localização nuclear do receptor. Essa região localiza-se entre os domínios do DBD e do LBD e é pouco conservada entre os diferentes receptores nucleares (Yen 2001).

1.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS RECEPTORES NUCLEARES

A ligação de uma substância agonista induz uma mudança conformacional no LBD, caracterizada por uma profunda alteração da posição da hélice 12 localizada na região C-terminal. Essa mudança permite a interação do LBD com proteínas co-ativadoras (CoA), que, subsequentemente, ativam a transcrição de genes-alvo. Em contraste, a ligação de uma substância antagonista não permite que a hélice 12 se reorienta. Substâncias antagonistas recrutam proteínas co-repressoras (CoR) para o LBD, e eventualmente suprimem a expressão do gene-alvo (McKenna, Lanz et al. 1999; Bourguet, Germain et al. 2000; Aranda and Pascual 2001).

Há, no entanto, considerada variação no recrutamento desses co-reguladores no estado sem ligantes: alguns RN atraem proteínas CoA, enquanto receptores do ácido retinóico, da vitamina D, e dos hormônios tireoideanos atraem proteínas CoR (McKenna, Lanz et al. 1999; Aranda and Pascual 2001).

Os membros da superfamília dos receptores nucleares são fatores transcricionais que controlam vias essenciais do desenvolvimento e da fisiologia (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995). Possuem eles, como visto, uma estrutura modular e a sua ligação ao DNA se faz como monômeros ou dímeros através do módulo ligante ao DNA, o qual se liga a seqüências nucleotídicas específicas do DNA, conhecidas como elementos responsivos hormonais (HREs) (Barra, Velasco et al. 2004).

A superfamília dos receptores nucleares consiste de receptores que ligam hormônios esteroidais (como estradiol e cortisona); ligantes não esteroidais (como o ácido retinóico e hormônios tiroideanos); diversos produtos do metabolismo do lipídeo (como o ácidos graxos e ácidos biliares); bem como um grande grupo de receptores orfãos, cujas descobertas tem precedido a de seus ligantes (Giguere 1999).

Os receptores para os hormônios esteróides formam uma subclasse da superfamília de receptores nucleares (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995). Na ausência do ligante, os receptores de esteróides - glicocorticóide (GR), mineralocorticóide (MR), androgênios (AR), estrogênios (ER) e progesterona (PR) - estão associados às proteínas de choque térmico localizadas no citoplasma e, em alguns casos, no núcleo da célula. A ligação do hormônio dissocia os receptores dessas proteínas e induz à formação de homodímeros que se dirigem ao núcleo onde ligam-se aos seus respectivos elementos responsivos (HREs), regulando a transcrição (Neves, Webb et al. 2002).

Outra subclasse da superfamília de RN é representada pelos receptores dos hormônios tireoideanos (TR), do ácido retinóico (RAR), da vitamina D (VDR), e dos proliferadores peroxissomais (PPAR). Os membros dessa subclasse formam heterodímeros com o RXR (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995). Esses receptores, na ausência do ligante, estão localizados predominantemente no núcleo, em solução ou ligados ao DNA. Os receptores, na ausência do ligante, ficam ligados a proteínas co-repressoras e atuam como fortes repressores da transcrição gênica. As proteínas co-repressoras agem recrutando histonas desacetilases, uma atividade que mantém a cromatina condensada. Com a chegada do ligante o complexo co-repressor se desliga do receptor nuclear, o qual fica livre para interagir com os complexos de co-ativadores. A ação desses co-reguladores contribui para o afrouxamento da cromatina, facilitando a interação entre os receptores nucleares e a maquinaria transcricional, o que leva a ocorrência da expressão gênica (Aranda and Pascual 2001).

Por fim, os receptores nucleares podem regular a transcrição gênica por meio da interação indireta com outros fatores de transcrição. É um processo que não depende da ligação do receptor ao DNA.

Na **Figura 3** está representado o mecanismo de ação dos RN.

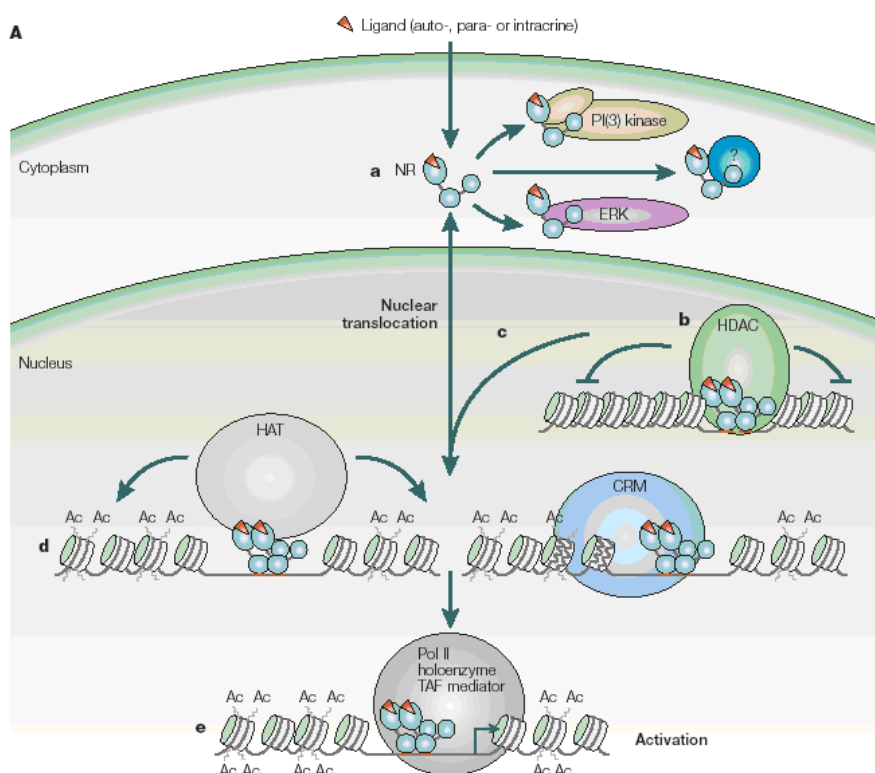


Figura 3. Receptores nucleares em ação. Modo de ação do receptores nucleares (RN): após difundir-se pela membrana citoplasmática, o ligante pode interagir com receptores cognates e exercer um efeito não genômico por interagir diretamente, como por exemplo, com quinases (a). A razão de localização entre citoplasma e núcleo pode variar entre diferentes receptores e é afetada pela natureza do ligante. A ligação do ligante no receptor modula uma grande quantidade de fatores. Na ausência do ligante, vários RN são levados a se ligar com regiões regulatórias de genes-alvos com um complexo co-repressor ou com histonas desacetilases (HDAC) (b). Histona desacetilase é responsável pela condensação da cromatina que causa o efeito silenciador do gene. A ligação do ligante dissocia o complexo HDAC (c) e resulta no recrutamento de histonas acetiltransferase (HAT) e de complexos de remodelação de cromatina (CRM) (d). A ordem temporal e requerimento desses complexos pode ocorrer em: um receptor, um gene-alvo ou uma célula-específica. No último degrau (e), a holoenzima poliferase II, que inclui a enzima pol II, TAF (TATA fator de ligação associado à proteína), e complexos mediadores. Esse recrutamento aumenta a frequência da inicialização da transcrição. **Abreviaturas:** AD-domínio de ativação; AF1-função de ativação 1; NLS-sinal de localização nuclear.

Fonte: Hinrich Gronemeyer et al (2004) www.nature.com/reviews/drugdisc

1.5. RECEPTORES COMO ALVOS FARMACOLÓGICOS

Os RN são alvos ideais para descoberta de novos fármacos, não somente porque controlam uma infinidade de processos biológicos e doenças, mas porque são regulados por pequenas moléculas lipofílicas que podem ser facilmente trocadas por um fármaco alternativo (Sladek 2003).

Receptores nucleares são fatores transcricionais essenciais no desenvolvimento embrionário, na manutenção de diferenciação de fenótipos celulares, no metabolismo celular e no processo de sua morte. Disfunção na sinalização do receptor nuclear pode causar doenças proliferativas, reprodutivas e metabólicas, como o câncer, infertilidade, obesidade e diabetes (Laudet and Gronemeyer 2001).

Substâncias agonistas e antagonistas de RN, como tamoxifeno para receptor do estrogênio (alvo do câncer de mama), tiazolidinonas para o receptor dos proliferadores peroxissomais (alvo do diabetes tipo II) ou dexametasona para o receptor do glicocorticoide (alvo das doenças inflamatórias), são fármacos freqüentemente utilizados. Estas doenças representam um grande mercado mundial para a prescrição de fármacos (Gronemeyer, Gustafsson et al. 2004).

A intensidade das pesquisas sobre novos fármacos que tenham ação nos receptores nucleares pode ser medida pelo fato de que, estimadamente, entre 15% e 30% dos medicamentos produzidos no mundo, principalmente os anticoncepcionais, atuam de uma forma ou de outra sobre os receptores nucleares (Sugimoto 2003).

Durante muitos anos, acreditou-se que um fármaco agiria como agonista ou antagonista de um determinado receptor, independente do órgão ou tecido em que esse receptor agisse. No entanto, foi demonstrado que algumas moléculas estruturalmente próximas dos estrogênios são agonistas em alguns tecidos e antagonistas em outros, apesar de atuarem sempre no mesmo receptor. Um exemplo é o tamoxifeno, que atua como antiestrogênico na mama e como agonista no endométrio e no tecido ósseo (Howell, Johnston et al. 2004).

Por estarem os receptores nucleares envolvidos diretamente ou indiretamente em várias patologias, abre-se um vasto campo para a procura e desenvolvimento de novos fármacos que neles atuem.

As **Tabelas 2 e 3**, a seguir, demonstram as desordens endócrinas ocorridas devido a mutações no RN com ligantes e nos receptores órfãos.

Tabela 2. Desordens endócrinas ocorridas por mutações em RN ligante-dependentes e local de mutação

| Receptor | Doença | Sinais | Local | Herança | Mutação | No.* |
|-------------|---|---|----------|-----------|---------|------|
| TR β | Resistência aos hormônios tireoideanos | bócio, hiper-atividade, bradicardia | 3p24.3 | AR, AD, S | P.D. | >100 |
| VDR | Raquitismo hereditário por resistência à vitamina D | Hipocalcemia, raquitismo, baixa estatura, alopecia | 12q12-14 | AR | P | >20 |
| ER α | Resistência ao estrogênio | estatura alta, osteoporose | 6p25.1 | AR, S | P | 1 |
| GR | Resistência ao Glicocorticóide | Hipertensão, hiperandrogenismo, infertilidade, fadiga | 5q31 | AR, AD, S | P | 8 |
| MR | Pseudohipoadosteronismo Tipo 1 | hipotensão, perda de sal | 4q31.1 | AD | P | 13 |
| AR | Síndrome de insensibilidade ao androgênio | Submasculinização (completa, parcial), infertilização masculina | Xcen-q13 | XL.S | PD | >300 |

Abreviaturas: AR = recessivo autosomal; AD = dominante autosomal; S = mutação celular somática; XL = X-ligado; P = ponto de mutação; D = deleção, * números aproximados de diferentes mutações apresentados em cada receptor.

Fonte: John C. Achermann¹ and J. Larry Jameson, 2003. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 75, Nos. 11–12, pp. 1785–1796

Tabela 3. Mutações em receptores órfãos

| Receptor | Doenças | Local | Herança | Mutação | Número |
|-----------------|--|------------|---------|---------|--------|
| PPAR γ 2 | Obesidade, resistência à insulina | 3p25 | AD | P | 4 |
| HNF4 α | MODY 1 | 20q12-13.1 | AD | P | 10 |
| PNR | Aumento da síndrome do cone S | 15q23 | AD, AR | P | 12 |
| NURR1 | Esquizofrenia/BPD | 2q22-23 | AD | P | 4 |
| SF-1 | Falência da adrenal primária XY sex-reversível | 9q33 | AD, AR | P | 3 |

| | | | | | |
|------|--|-----------------|----|-----|-----|
| DAX1 | Hipoplasia adrenal congênita, hipogonotropismo,deficiência na espermogênese | Xp21.3- 21.2 | XL | P.D | >80 |
|------|--|-----------------|----|-----|-----|

| | | | | | |
|-----|------------------|--------|----|---|---|
| SHP | Obesidade branda | 1p36.1 | AD | P | 9 |
|-----|------------------|--------|----|---|---|

Abreviaturas: BPD = desordem bipolar. **Fonte:** John C. Achermann¹ and J. Larry Jameson, 2003. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 75, Nos. 11–12, pp. 1785–1796

1.5.1. Receptores do estrogênio (ER)

O hormônio esteroideal estrogênio é importante para uma grande variedade de processos fisiológicos nas mulheres e nos homens. Esse hormônio está envolvido no crescimento, na diferenciação e na função de tecidos do sistema reprodutivo, incluindo glândulas mamárias, útero, vagina e ovários nas fêmeas e testículos e próstata nos machos. Ele também participa de importantes vias na manutenção da densidade óssea e na proteção contra osteoporose, além de ser considerado um cardioprotetor e possuir efeito sobre lipídios no sangue. No cérebro, o estrogênio regula o comportamento reprodutivo, a produção de gonadotrofina, a liberação de hormônios pela glândula pituitária, o humor e o comportamento social (Osborne, Zhao et al. 2000).

A ação estrogênica é mediada por receptores intracelulares. Os receptores de estrogênio com a ligação do ligante são translocados para o núcleo onde ativam a transcrição gênica.

Existem dois subtipos de receptor de estrogênio (ER α e ER β) que apresentam distinção celular e diferenciação de distribuição tecidual (Diaz and Sneige 2005).

Estrogênios e moduladores do ER ligam-se no ER α e/ou no ER β para formar complexos moleculares que exercem efeitos pleiotrópicos em tecidos específicos por modulação da expressão de genes-alvo (Pinzone, Stevenson et al. 2004).

Na ausência do hormônio, os receptores dos hormônios esteróides existem como complexos oligoméricos inativos, complexados com outras proteínas, incluindo proteínas chaperonas, chamadas de proteínas de choque Hsp90 e Hsp70, e ciclofelin-40 e p23 (Pratt and Toft 1997). O papel das Hsp90 e outras chaperonas pode ser o de manter os receptores em uma conformação apropriada para responder rapidamente aos sinais hormonais. Com a ligação do hormônio o complexo oligomérico se dissocia, permitindo aos receptores funcionarem diretamente como fatores transcrpcionais por ligação ao DNA em genes-alvo ou indiretamente ao modularem a atividade de outros fatores transcrpcionais (White and Parker 1998).

Embora os domínios de ligação ao DNA do ER α e ER β apresentem alto grau de homologia (97%), o domínio de ligação ao ligante apresenta somente 57% de homologia (**Figura 4**). Essas diferenças abrem a possibilidade de desenvolver-se ligantes ER α e ER β específicos (Gustafsson 1999).

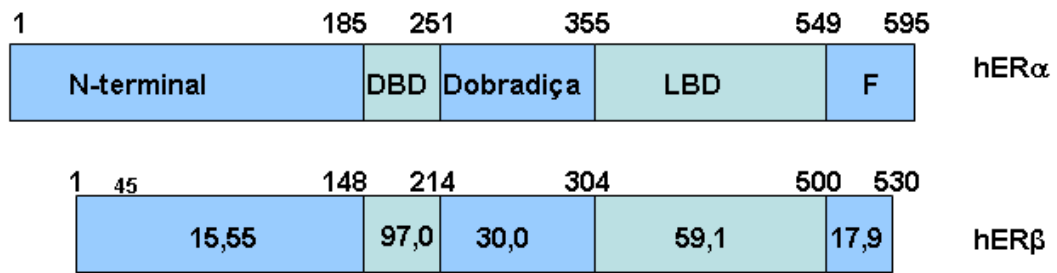


Figura 4. Comparação das estruturas primárias dos ER α e ER β , respectivamente. As figuras acima representam os receptores e indicam o número de aminoácidos, com o número 1 começando no N-terminal. Os números dentro do receptor ER β representam o grau de homologia entre os respectivos domínios nos dois receptores.

Fonte: J-A Gustafsson, 1999. Estrogen receptor β – a new dimension in estrogen mechanism of action. *Journal of Endocrinology* 163, 379–383.

O número de células que expressam ER β mantém-se relativamente constante durante a gravidez, a lactação, a pós-lactação e os estágios da pré-puberdade e puberdade. Já a porcentagem de ER α nas células varia dramaticamente nessas situações (Nilsson and Gustafsson 2000).

O ER β é amplamente distribuído no organismo. Os tecidos que se mostram ricos em ER β estão no pulmão, no rim, no trato urogenital, na glândula mamária, no cólon, nos órgãos reprodutivos e nos sistemas nervoso central, cardiovascular e imunológico (Taylor and Al-Azzawi 2000).

Útero, mama (Zhao and Brinton 2005) e pituitária são alvos ER α bem conhecidos; embora também existam alvos em outros tecidos como o ósseo, o cardiovascular e o sistema nervoso central (Couse and Korach 1999).

Estudos têm demonstrado que ambos, ER α e ER β , podem equivalentemente promover a sobrevivência neuronal por ativação de mecanismos de ação do estrogênio em neurônios do hipocampo de ratos. Em adição, há outras evidências indicando que ER β é uma chave para ativação de mecanismos da indução estrogênica da plasticidade morfológica neuronal e dos desenvolvimentos cerebral e cognitivo. (Zhao and Brinton 2005).

A **Tabela 4** demonstra a distribuição do ER α e do ER β em tecido humano adulto.

Tabela 4. Imunolocalização, em tecidos de humanos adultos, das isoformas α e β do receptor do estrogênio

| Tecido | ERα | ERβ | Tecido | ERα | ERβ |
|---|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Sistema Nervoso Central | | | Estômago | | |
| Córtex cerebral | | | Células epiteliais | - | + |
| Neurônios | - | + | Células de Goblet | + | - |
| Oligodendrócitos | + | + | Glândulas endócrinas | - | - |
| Células gliais | + | + | Sistema Endócrino | | |
| Cerebelo | | | Pituitária | | |
| Células gliais em camada molecular | - | + | Anterior | + | + |
| Pequenas células nervosas em camada granular | - | + | Posterior | + | + |
| Células de Purkinje | + | - | Tireóide | | |
| Hipocampo | + | - | Células epiteliais foliculares | - | + |
| Medula oblongada | | | Células-C tireóide | - | + |
| Células endodimais | - | + | Fibroblasto | + | + |
| Coração e Sistema Vasculár | | | Células endoteliais | + | + |
| Coração | | | Ovário | | |
| Miocárdio | + | + | Células granulosas | + | + |
| Endocárdio | - | - | Células Tecais | + | + |
| Epicárdio | - | - | Células estromais | + | + |
| Fibras de Purkinje | + | - | Sistema reprodutivo masculino | | |
| Vasos | | | Testículo | | |
| Aorta | + | + | Células de Sertoli | + | + |
| Artéria coronária | + | + | Células de Leydig | + | + |
| Artéria carótida | + | + | Próstata | | |
| Veia cava inferior | + | + | Estroma fibrocolagenoso | - | + |
| Sistema Respiratório e canal Alimentar | | | Células epiteliais da glândula mucosa | - | + |
| Pulmão (bronquíolos) | | | Células epiteliais uretral | - | + |
| Epitélio colunar | - | + | Sistema reprodutivo feminino | | |
| Células intermediárias | - | + | Vagina | | |
| Células basais | + | + | Camada epitelial | + | + |
| Células do músculo liso | + | + | Camada de tecido conectivo | - | + |
| Esôfago | | | Útero | | |
| Epitélio escamoso estratificado | + | + | Epitélio luminal do endométrio | + | + |
| Glândulas da mucosa esofágica | - | + | Epitélio glandular do endométrio | + | - |
| Fígado | | | Miométrio | + | + |
| Hepatócitos | + | - | Mama | | |
| Células de Kupfer | - | - | Adipócitos | + | + |
| Vênulas | - | - | Células mioepiteliais | + | + |
| Ducto biliar | - | - | Tecido conectivo | + | + |
| Veia porta hepática | + | + | | | |

(-) Coloração imunoreativa não observada; (+) imunoreatividade positiva no núcleo; (*) coloração presente no citoplasma.

Fonte: A. H. Taylor and F. Al-Azzawi, 2000. Immunolocalization of oestrogen receptor beta in human tissues J. of Molecular Endocrinology 24, 145-155

Como ER β é altamente expresso no cérebro e tem pequena expressão ou ausência na mama ou útero, descobrir e designar moléculas seletivas para esse receptor promoverá uma estratégia de ativação dos efeitos benéficos do estrogênio no cérebro sem ativação desfavorável dos efeitos do estrogênio nos órgãos reprodutivos. Essas informações nos mostram o potencial de aplicação terapêutica para o ER β como um alvo terapêutico para promover a função da memória e mecanismos neuronais de defesa contra a neurodegeneração relacionada com a idade, tal qual o mal de Alzheimer (Zhao, Wu et al. 2004).

A distribuição distinta dos receptores ER α e ER β tem aumentado o interesse por novos alvos estrogênicos e tem levado à percepção de novos sítios para intervenção farmacológica em doenças como depressão, disfunção da próstata, leucemia, inflamações dos intestinos e câncer de cólon (Gustafsson 2003; Zhao and Brinton 2005). (**Tabela 5**)

Tabela 5. Receptores de estrogênio como alvos de doenças. Tecidos-alvo, receptores presentes, patologias associadas e sugestões farmacológicas

| Tecidos-alvo | Receptor de estrogênio presente | Doenças | Sugestão Farmacêutica |
|------------------------------|---|---|---|
| Útero | ER α | Câncer de útero | Antagonista de ER α |
| Estroma da próstata | ER α | Hiperplasia benigna de próstata | Antagonista de ER α |
| Células theca do ovário | ER α | Síndrome do ovário policístico | Agonista de ER α |
| Osso | ER α | Osteoporose | Agonista de ER α |
| Epitélio da mama | ER α , ER β , ER β_{cx} ² | Câncer de mama | Antagonista de ER α e/ou agonista de ER β |
| Estroma da mama | | | |
| Cérebro | ER α , ER β | Hipertensão Obesidade Demência | Agonista de ER α Agonista de ER β Agonista de ER β |
| Gânglio simpático | ER β | Hipertensão Controle da bexiga | Agonista de ER β Agonista de ER β |
| Cólon | ER β | Câncer de cólon | Agonista de ER β |
| Epitélio da próstata | ER β , ER β_{cx} ² | Câncer de próstata | Agonista de ER β |
| Células granulosas do ovário | ER β | Infertilidade, síndrome do ovário policístico | Agonista de ER β |
| Rafe dorsal | ER β | Depressão | Agonista de ER β |
| Osso marrom | ER β | Leucemia | Agonista de ER β |

Fonte: Jan-A^o ke Gustafsson. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. Trends in Pharmacological Sciences. Vol.24, n.9, September 2003.

Antagonistas de ER e inibidores da síntese de estrogênio são amplamente usados como agentes terapêuticos no tratamento de câncer de mama (Vogel 2003), enquanto agonistas de ER são agentes padrões usados na terapia de reposição hormonal na mulher pós-menopausada (Burkman 2003).

Os sintomas da menopausa são normalmente tratados com estrogênios sintéticos. Entretanto, a terapia de reposição hormonal convencional é suspeita de aumentar o risco de câncer de mama e de causar outros efeitos indesejados como por exemplo, sangramento uterino e sensibilidade mamária (Rossouw, Anderson et al. 2002).

Durante a menopausa há normalmente uma redução na produção de estrogênio e um aumento na secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). Essa troca hormonal parece ser responsável pelo aparecimento de sintomas tais como: fogachos, diminuição da lubrificação vaginal, insônia, depressão, comprometimento do sistema nervoso central (principalmente a doença de Alzheimer) e alterações dos metabolismos ósseo e cardiovascular (Mayo 1999). Os sintomas causados pela menopausa podem ser amenizados com a terapia de reposição hormonal.

Os efeitos colaterais mais sérios causados por uso de agonistas do ER são: aumento dos riscos de trombose, de câncer de mama e de endométrio (Nystedt, Berglund et al. 2003). O uso de antagonista do ER está associado com: cânceres de mama e de endométrio, sintomas cardiovasculares (fogachos e ansiedade), disfunção sexual (ressecamento vaginal, distúrbio psicosexual) e desenvolvimento de tumores independentes de estrogênio (Mourits, Bockermann et al. 2002).

1.5.2. Receptor do glicocorticóide – GR

Glicocorticóides (GC) são hormônios esteroidais sintetizados e secretados pelo córtex adrenal. Esses hormônios apresentam atividade na homeostase, no desenvolvimento fisiológico, na diferenciação celular e na resposta ao estresse, fazendo conexão direta entre sinais extracelulares e a resposta transcricional (Carvalho 1997). Os GC apresentam como característica atravessar a membrana lipoprotéica das células, ligando-se a receptores citosólicos e exercendo sua ação no interior do núcleo. As ações desses hormônios são mediadas pelo receptor do glicocorticóide (GR) (Charmandari, Kino et al. 2004).

Os GC agem em células-alvo via duas isoformas do GR chamadas GR α (isoforma hormônio ligante) e GR β (isoforma que não se liga a nenhum hormônio) (Gupta and Lalchhandama 2002).

Na ausência do hormônio, o GR existe no citosol como parte de um heterocomplexo multi-chaperona que possui um ciclo de associação e dissociação das chaperonas e co-chaperonas, permanecendo inativo no citoplasma (Gupta and Lalchhandama 2002).

Quando o hormônio liga-se ao receptor, a interação com HSP-90 é desfeita, expondo as seqüências de localização nuclear (NLS). São assim permitidas a migração do complexo hormônio-receptor para o núcleo e a interação desse complexo com seqüências específicas no DNA, denominadas GRE (elementos de resposta a glicocorticóides). Por esse processo, ocorre a modulação da transcrição de diferentes genes responsivos à GC.

A estrutura molecular do receptor de glicocorticóide humano é similar a qualquer outro receptor nuclear, sendo também composta por três domínios funcionais: o amino-terminal, o DBD e o LBD (Charmandari, Kino et al. 2004).

A ligação de um hormônio GC no GR α leva à sua ativação e translocação do citoplasma para o núcleo onde sofre dimerização. Essa ligação (GC-GR) pode modular a gene transcrição no núcleo por dois mecanismos: direto e indireto. A ativação direta ou repressão de genes-alvo pelo complexo GC-GR tem sido chamada de mecanismo de ação tipo 1. Já a inibição indireta de genes-alvo por GR hormônio ativado tem sido chamada de mecanismo de ação tipo 2 (Gupta and Lalchhandama 2002). Os mecanismos de ação do GR estão esquematizados nas **Figuras 5 e 6**.

O GR está comumente distribuído em quase todos os tipos de células e tem uma participação essencial nos metabolismo e crescimento celulares, estando envolvido em inúmeros eventos biológicos nos tecidos. (Warriar, Page et al. 1996).

Glicocorticóides medeiam uma grande variedade de sistemas e funções cerebrais, facilitando a eficiente adaptação a mudanças internas e externas (Murphy, Spencer et al. 2002).

No que diz respeito à obesidade, provavelmente uma doença multifatorial com importante componente genético, verificou-se em modelos animais com obesidade induzida que a atividade do GR é uma importante via na etiologia e na manutenção do estado obeso. A atividade glicocorticóide mostra-se essencial para o desenvolvimento da hiperinsulemia e subsequente deposição de insulina. Em humanos, excesso de glicocorticóide está associado com a distribuição central de gordura (Pierreux, Stafford et al. 1999). Eles aumentam o

nível circulante de glicose por estimulação da expressão de enzimas da via da gliconeogênese e por decréscimo da entrada de glicose.

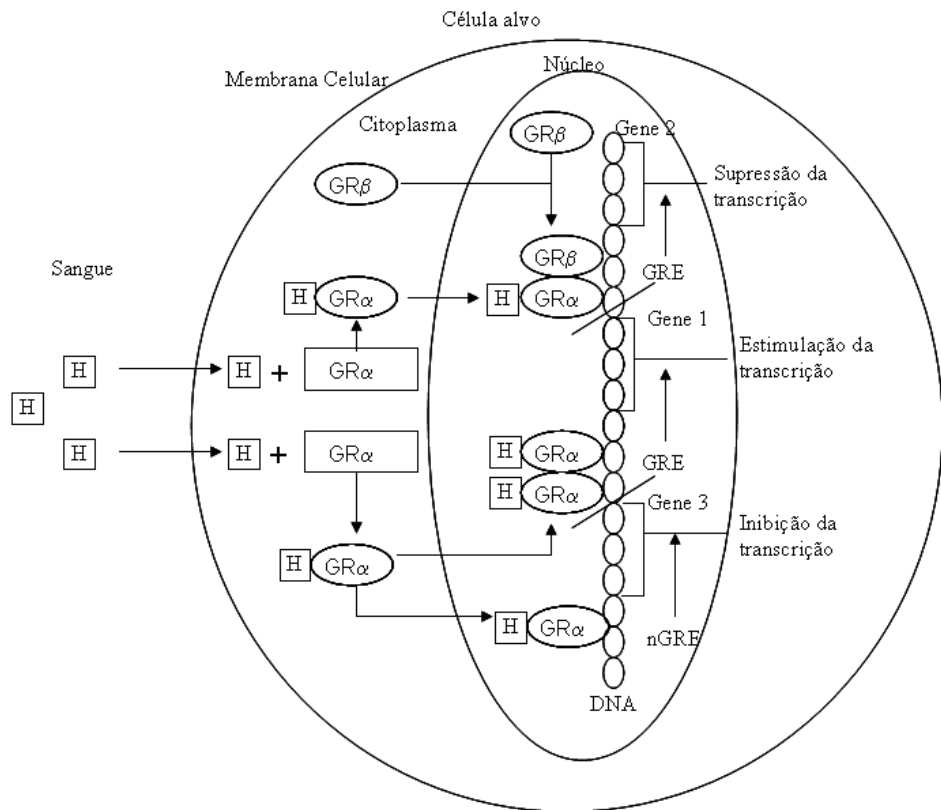


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo tipo 1 da ação dos hormônios glicocorticóides. Após a ligação de um glicocorticóide no GR α , esse complexo migra para o núcleo formando homodímeros (GR α -GR α) ou heterodímeros (GR α -GR β). O homodímero liga-se diretamente no elemento responsivo do glicocorticóide (GRE) e ativa a gene transcrição. A ligação de um heterodímero (GR α -GR β) no GRE induz a supressão na gene transcrição estimulada pelo GR α . O GR β reprime a função de estimulação do GR α por inibir especificamente a transcrição mediada pelo GRE. A ligação de um complexo GR-hormônio (sem a formação de dimerização) no GRE inibe a gene transcrição. **Abreviações:** GR: receptor do glicocorticóide; GR α : isoforma α do GR; GR β : isoforma β do GR; GRE: elemento responsivo do GR; nGRE: elemento responsivo negativo do GR. **Fonte:** Gupta and Lalchandama (2002) "Molecular mechanisms of glucocorticoid action" Current Science **83**(9): 1103-1111.

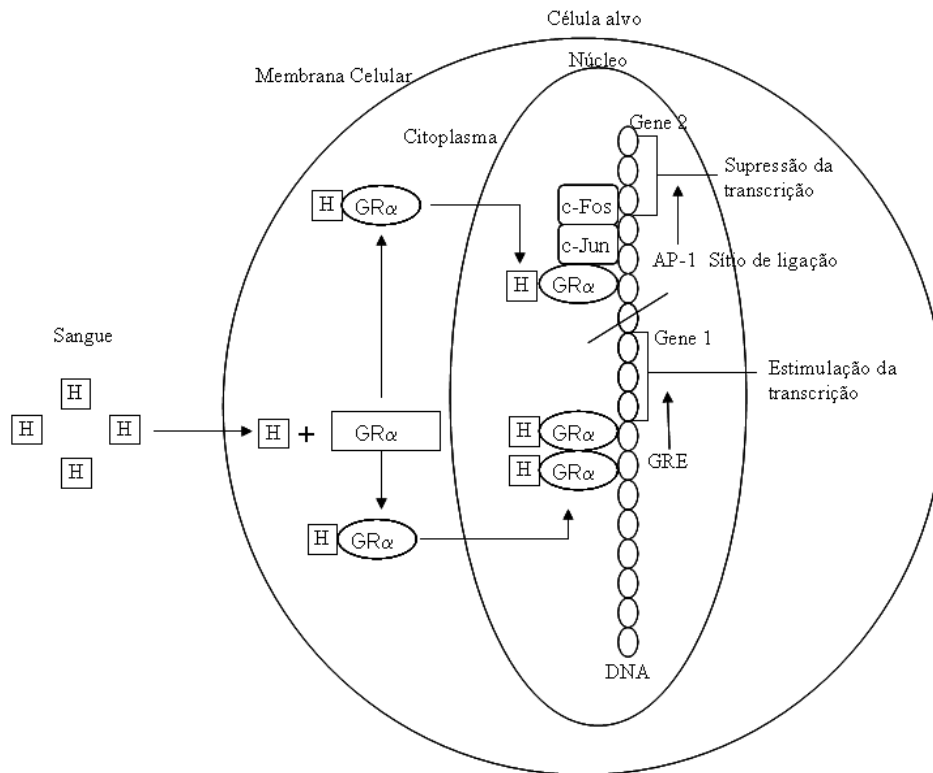


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo tipo 2 da ação dos hormônios glicocorticóides. Nesse tipo de ação, o hormônio liga-se no GR α e esse complexo liga-se em um fator transcricional (FT) (exemplo: *c-Jun*, *c-Fos*), inibindo a transcrição induzida pelo FT. Por exemplo, o complexo CG-GR α se liga no dímero *c-Jun*, *c-Fos* e suprime a gene transcrição estimulada por esse dímero. Em geral, um dímero de GR α se liga em um GRE e estimula a transcrição de um gene-alvo. **Abreviações:** AP-1 sítio de ligação: sítio de ligação da proteína de ativação 1; GR: receptor de glicocorticóide; GRE: elemento responsivo de GR; H: hormônio.

Fonte: Gupta and Lalchandama (2002) “Molecular mechanisms of glucocorticoid action” *Current Science* **83**(9): 1103-1111.

Os GC são muito utilizados na terapêutica, pois bloqueiam o processo de inflamação, suprimem a ativação do sistema imune e atuam como agentes inibidores do crescimento, *in vitro* e *in vivo*. Assim, são empregados na terapia aguda e crônica de diversas doenças imunes, sendo largamente aplicados no tratamento de doenças pulmonares severas, como a asma brônquica (Verheggen, van Hal et al. 1996). Verifica-se ainda a sua utilização contra a artrite reumatóide, em quimioterapia de neoplasmas linfóides por causarem apoptose nessas células e como imunossuppressores quando da prevenção da rejeição celular/tecidual de órgãos transplantados (Carvalho 1997; Tuckermann, Reichardt et al. 1999). Os glicocorticóides regulam também o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. (Pierreux, Stafford et al. 1999). A **Figura 7** demonstra as principais ações dos Glicocorticóides nos mamíferos.

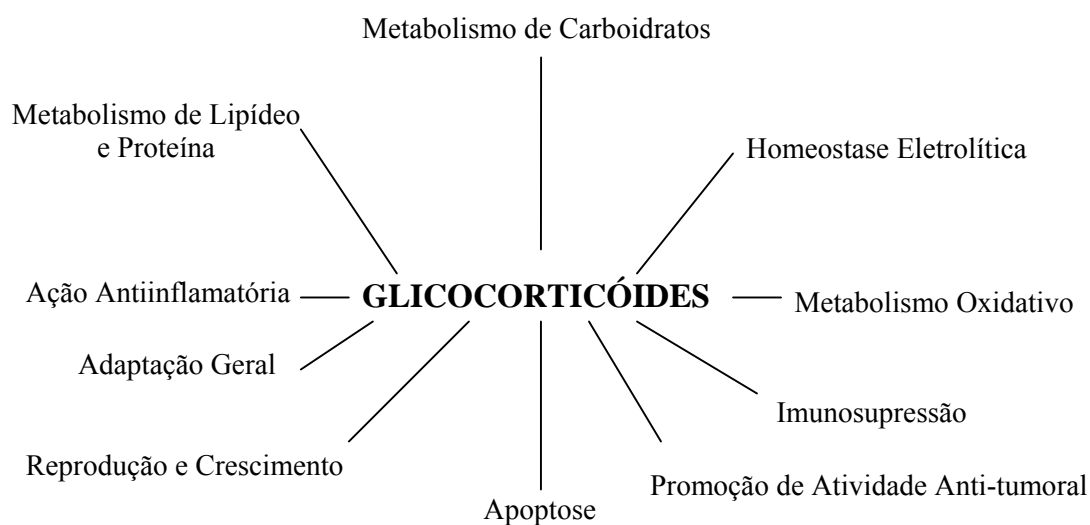


Figura 7. Maiores ações dos glicocorticóides em mamíferos.

Fonte: Gupta and Lalchandama (2002) “Molecular mechanisms of glucocorticoid action” Current Science **83**(9): 1103-1111.

1.6. PLANTAS MEDICINAIS

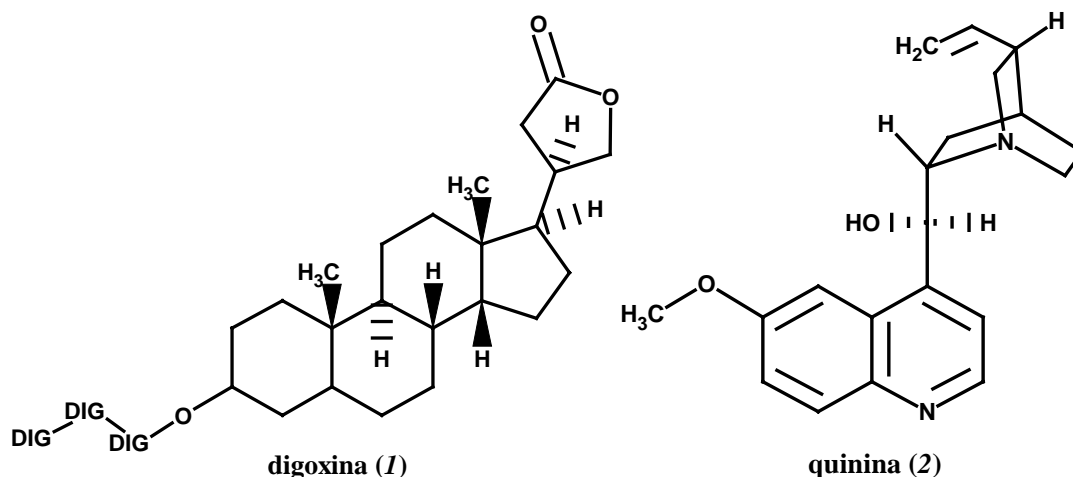


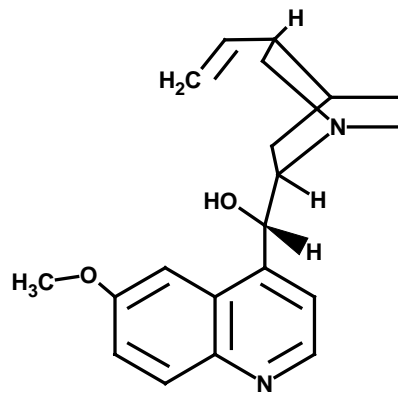
Banca de Plantas Mediciniais. Foto gentilmente cedida por Emília Vitória da Silva.

Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS, 85% da população mundial utiliza plantas medicinais para tratar agravos à saúde. No Brasil os percentuais são próximos, estima-se que 82% da população brasileira utilize produtos a base de ervas (Abifisa 2006). Ao longo do tempo têm sido registrados vários procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. De fato, em torno de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal (Hamburger and Hostettman 1991).

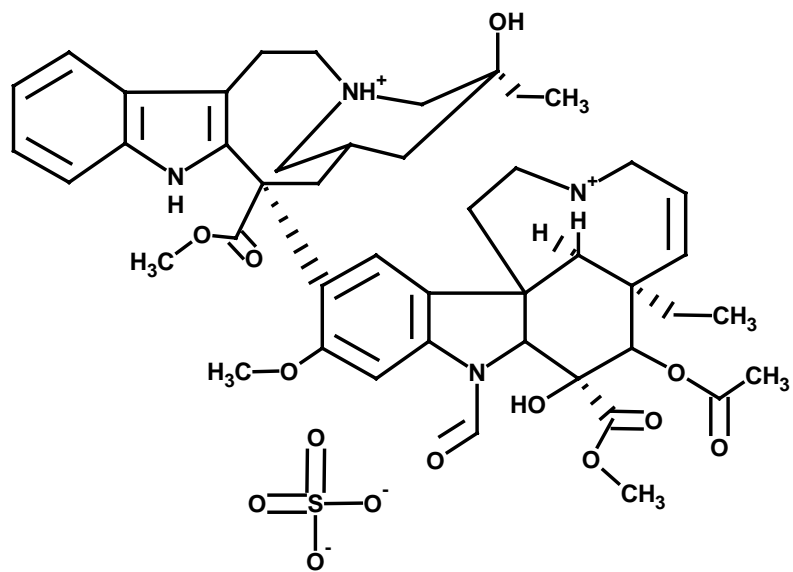
O Brasil inclui-se entre os países de maior biodiversidade mundial, abrigando cerca de 50 mil espécies de plantas superiores, distribuídas em grandes biomas: a Amazônia com 25-30 mil espécies, a Mata Atlântica com 16 mil, o Cerrado com 7 mil e as demais espécies distribuídas entre a Caatinga e a Floresta Subtropical (Barata and Queiroz 1995). Entretanto, apenas uma pequena parcela da flora brasileira tem sido pesquisada cientificamente quanto ao seu potencial de produção de fármacos. A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que possam ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (Veiga Jr and Pinto 2005).

Entre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela OMS, 11% são de origem exclusivamente vegetal e uma parcela significativa é preenchida por medicamentos sintéticos, obtidos de precursores naturais. Pode-se citar, por exemplo, importantes fármacos extraídos de plantas como a digoxina (1), obtida de espécies de *Digitallis*; a quinina (2) e a quinidina (3), obtidas de espécies de *Cinchona*, a vincristina (4) e a vimblastina (5), obtidas de *Catharanthus roseus*; a atropina (6) e a escopolamina (7), de *Atropa belladonna*; a morfina (8) e a codeína (9), de *Papaver somniferum* e também o paclitaxel (taxol) (10), obtido de espécies de *Taxus* (Rates 2001).

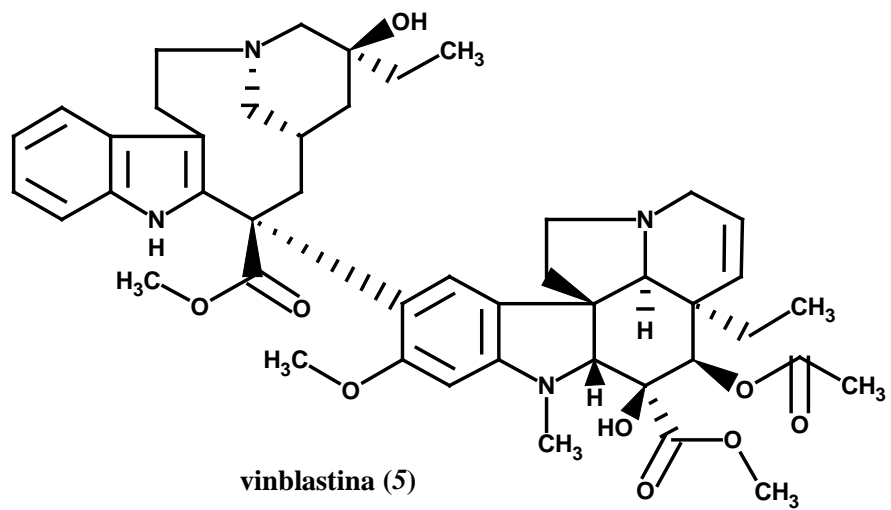




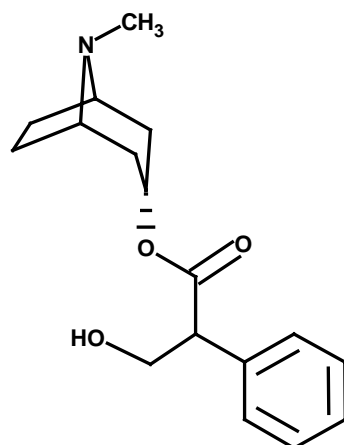
quinidina (3)



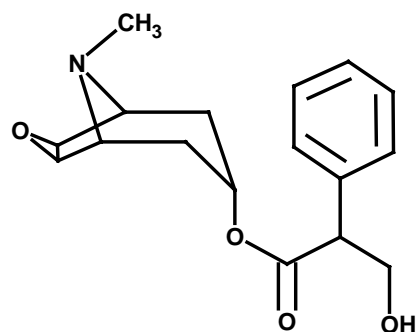
sulfato de vincristina (4)



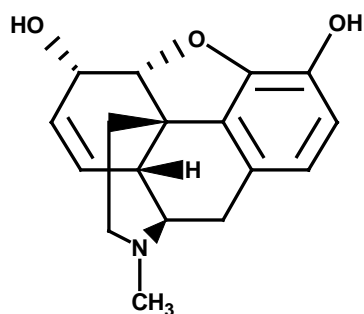
vinblastina (5)



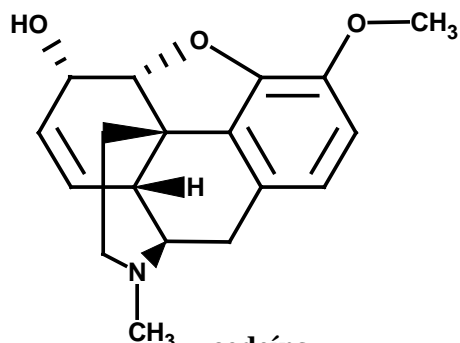
atropina
(6)



escopolamina (7)

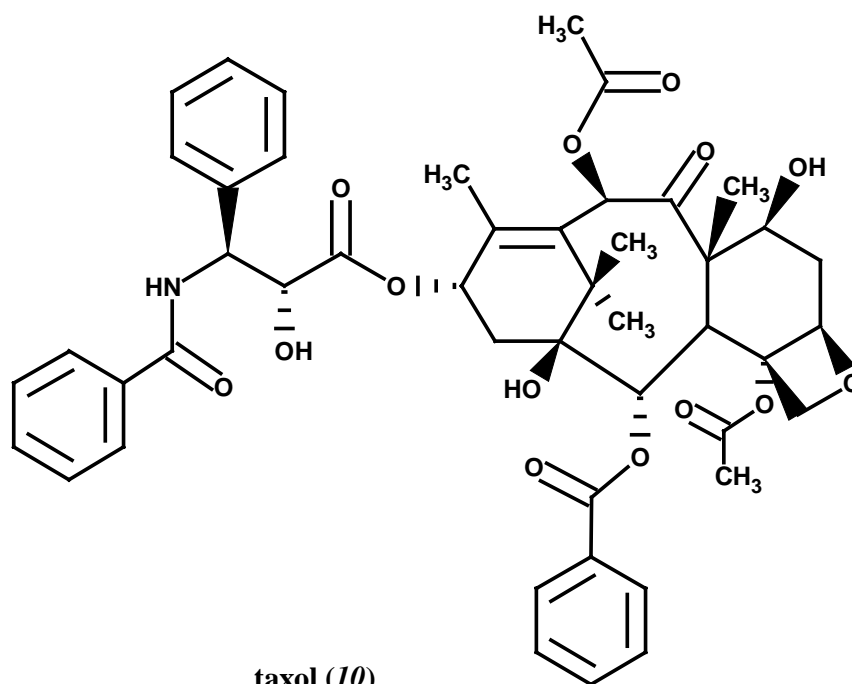


morfina (8)



codeína
(9)

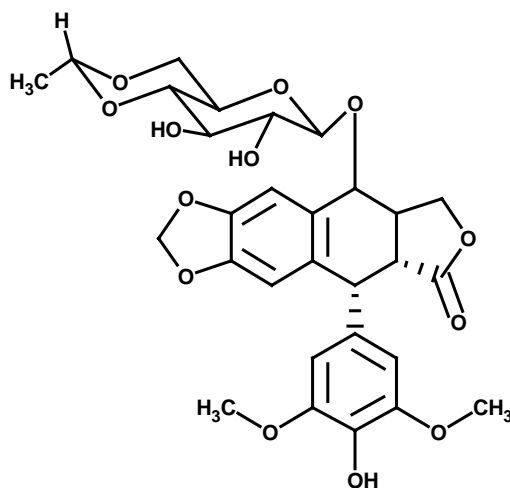
Durante a evolução humana, apresenta-se uma longa história do uso de plantas no tratamento de câncer. Elas têm sido fonte de alguns dos agentes anticâncer mais efetivos como vincristina, vimblastina (5), etoposídeo (11), teniposídeo (12) e paclitaxel (10) (Cragg, Newman et al. 1997).



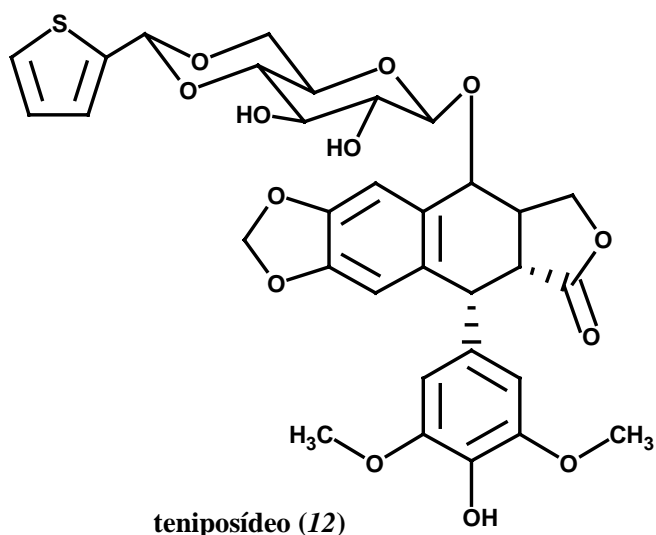
taxol (10)

Segundo dados da Abifisa (Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde), o mercado brasileiro do setor fitoterápico movimenta anualmente em torno de R\$ 1 bilhão em toda sua cadeia produtiva e emprega mais de 100 mil pessoas (Abifisa 2006).

Moléculas de origem vegetal têm sido a base do surgimento de moléculas protótipo, possibilitando o delineamento e o planejamento racional de novos fármacos e também a descoberta de novas ações farmacêuticas não atribuídas a compostos já conhecidos (Rates 2001).



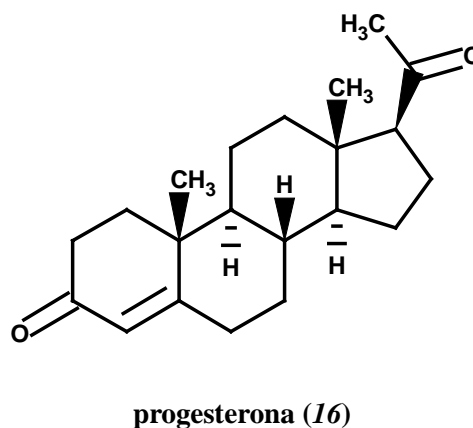
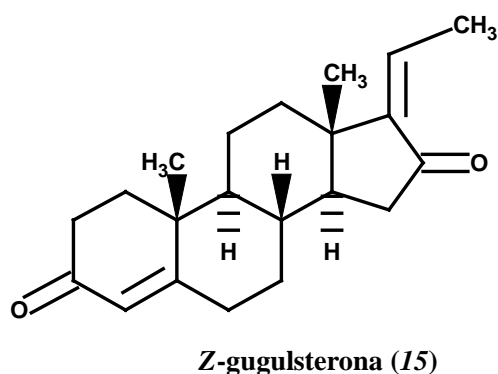
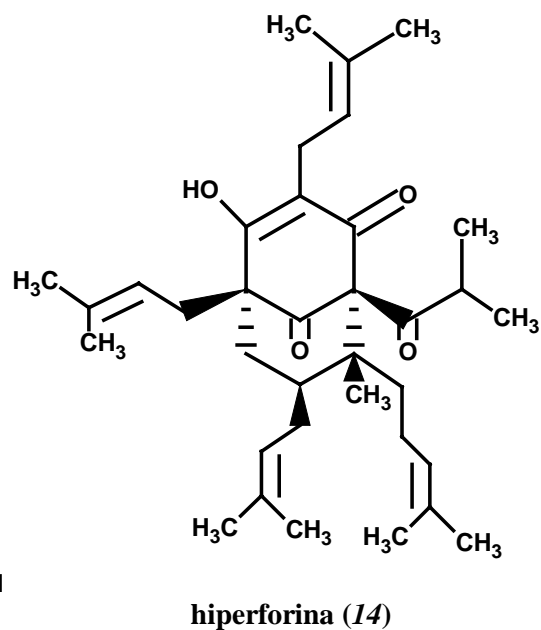
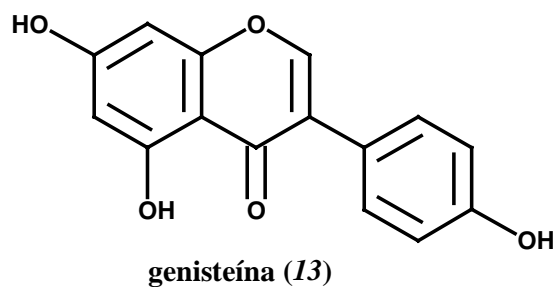
etoposídeo (11)



Inegavelmente, as plantas medicinais possuem um papel importante na terapêutica. Assim, a indústria farmacêutica e diversos grupos de pesquisa têm buscado a identificação de novos fármacos de origem vegetal, de forma a se avançar no combate às mais diversas doenças que afligem a espécie humana.

1.7. AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM VEGETAL EM RECEPTORES NUCLEARES

Produtos naturais, incluindo derivados de plantas superiores, têm contribuído grandemente para o desenvolvimento de novos fármacos. Trabalhos recentes têm demonstrado a presença em plantas medicinais de compostos com atividade em receptores nucleares. Dentre eles, pode-se citar o taxol (**10**) (ação agonista para o receptor de esteróide e xenobiótico - SXR) (Synold, Dussault et al. 2001), a genisteína (**13**) (ação agonista estrogênica) (Pike, Brzozowski et al. 1999), a hiperforina (**14**) (isolada da erva de São João e utilizada como antidepressivo tem ação no receptor dos pregnanos - PXR) (Moore, Goodwin et al. 2000) e a gugalsterona (**15**) (antagonista do receptor dos farnesóides - FXR) (Urizar, Liverman et al. 2002). Dessa forma, compostos isolados de plantas podem representar uma nova alternativa terapêutica no tratamento de diversas patologias..



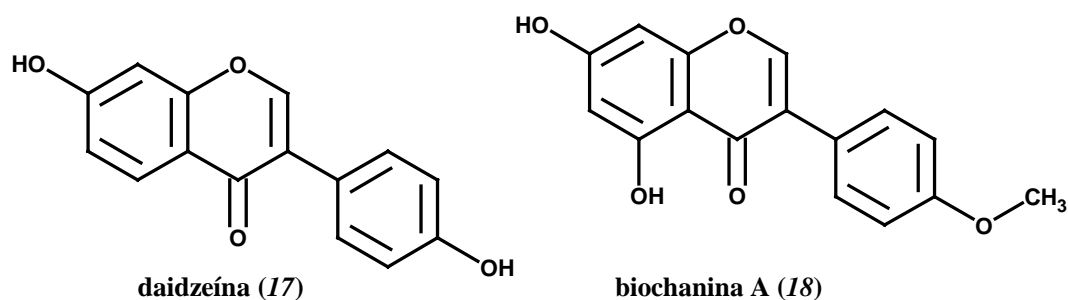
A partir de 1980, numerosos estudos foram publicados contendo análises quantitativa e qualitativa de hormônios sexuais de humano e de animais em plantas. Hormônios esteroidais têm sido encontrados em plantas como intermediários em diferentes vias da sua biossíntese (Janeczko and Skoczowski 2005). Em *Digitalis*, a progesterona (16) é um dos compostos intermediários na via de biossíntese de glicosídeos cardíacos (Finsterbusch, Lindemann et al. 1999). A **Tabela 6** apresenta o resultado de um estudo da presença de esteróides, incluindo hormônios sexuais de mamíferos, em várias espécies vegetais.

Tabela 6. Resultados de análise quantitativa e qualitativa de esteróides, incluindo hormônios sexuais de mamíferos, em material vegetal.

| Espécies | Esteróides (quantidade, caso estimada) | Método |
|---|--|-----------------------|
| <i>Phoenix dactylifera</i> L. (sementes) | estrona | TLC, CC |
| <i>Punica granatum</i> L. var. nana Pers. (semente, raiz, flores) | estrona (4µg/kg) estrona (4,5µg/kg) estrona (2,5µg/kg) | TLC, RIA |
| <i>Pinus silvestris</i> L. (pólen) | testosterona (0,8µg/10g) epitesterona (1,1µg/10g) androstenediona (5,9µg/10g) | VIS |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (planta inteira) | subst. similar ao estrogênio (equivalente em estrona a 0-8µg/100g peso seco, mudanças durante o procedimento) | KCR, TLC, CC |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (folhas e sementes) | 17β-estradiol (2-10µg/kg-planta fresca) (dados preliminares) | TLC, RIA, LC, CG-MS |
| <i>Salvia splendens</i> Sell. (planta inteira) | subst. similar ao estrogênio (equivalente em estrona a 0-50µg/100g peso seco, mudanças durante o procedimento) | KCR, TLC |
| <i>Hyoscyamus niger</i> L. (planta inteira) | subst. similar ao estrogênio (equivalente em estrona a 0-35µg/100g peso seco, mudanças durante o procedimento) | KCR, TLC |
| <i>Perilla octmotdes</i> (planta inteira) | subst. similar ao estrogênio (equivalente em estrona a 0-35µg/100g peso seco, mudanças durante o procedimento) | KCR, TLC |
| <i>Chenopodium rubrum</i> L. (planta inteira) | subst. similar ao estrogênio (equivalente em estrona a 0-20µg/100g peso seco, mudanças durante o procedimento) | KCR, TLC |
| <i>Hyacinthus orientalis</i> L. (bulbo) | subst. similar ao estrogênio (equivalente em estrona a 0-62µg/100g planta fresca) | KCR, TLC |
| <i>Hyphaene thebaica</i> L. (cerne da fruta) | estrona (5,13-5,25mg/kg) | KCR, UV, IR, NMR |
| <i>Prunus armeniaca</i> L. (sementes) | estrogênio | TLC |
| <i>Pastinaca sativa</i> L. (raiz) | androsterona (5,5-11,4 ng/g) | RIA, GLC-MS |
| <i>Zea mays</i> L. (óleo) <i>Olea europea</i> L. (óleo) <i>Olea europea</i> L. (cerne da fruta) | estrona (4µg/100mL) éster de estrona (9µg/100mL) estrona (8.1mg/240g) | KCR, TLC, UV, IR, NMR |
| <i>Pinus nigra</i> Ar. (pólen) | testosterona (0,7µg/10g) androstenediona (0,8µg/10g) progesterona (0,8µg/10g) | RIA |
| <i>Pinus nigra</i> Ar. (pólen) | androsterona (0,22µg/10g) androstenediona (0,90µg/10g) desidroepiandrosterona (1,5µg/10g) | TLC, GLC, RIA |

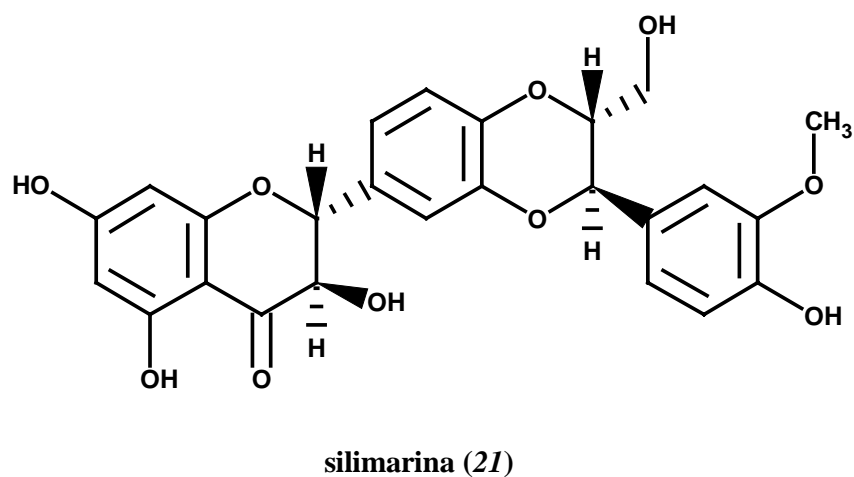
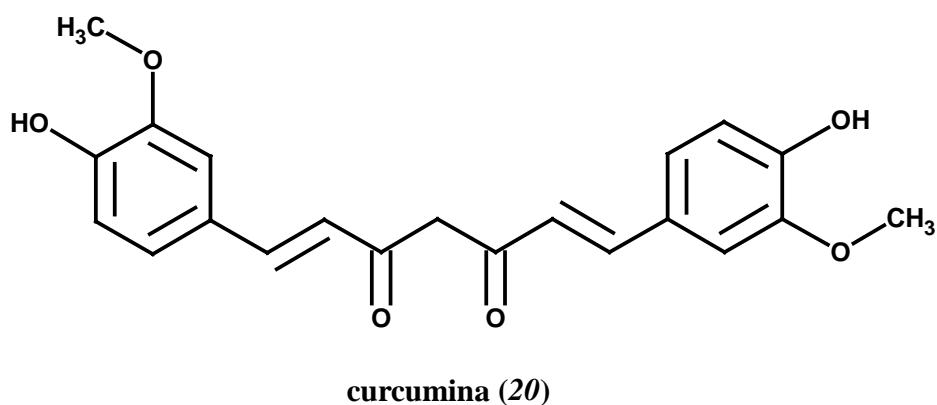
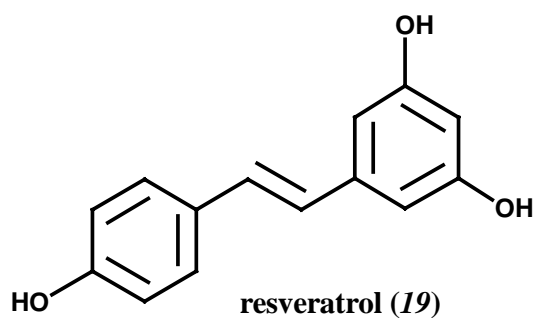
Fonte: Janeczkaend, Skoczwsqi, 2005. “Mammalian sex hormones in plants”. *Folia Histochem Cytobiol* 43(2): 71-9. **Abreviaturas:** **CC:** cromatografia de coluna; **CG:** cromatografia gasosa; **GLC:** cromatografia gasosa-líquida; **IR:** espectroscopia de absorção no infravermelho; **KCR:** reação colorida de Kober; **MS:** espectrômetro de massa; **NMR:** espectroscópio de ressonância magnética nuclear; **RIA:** radioimunoensaio; **TLC:** cromatografia de camada fina; **UV:** ultra-violeta; **VIS:** espectrofotometria em luz visível.

Os fitoestrogênios mais encontrados nas dietas são as isoflavonas. Estudos epidemiológicos demonstraram que as isoflavonas genisteína (**13**), daidzeína (**17**) e a biochanina A (**18**), encontradas principalmente em alimentos derivados da soja, são responsáveis pela menor incidência de osteoporose, de doenças cardiovasculares e de cânceres de mama e de endométrio em mulheres asiáticas que consomem uma dieta a base de soja (Clarkson, Anthony et al. 1998).



Além destes efeitos benéficos, os fitoestrógenos também reduziram a incidência de câncer de mama (Ingram, Sanders et al. 1997), sugerindo que esses compostos possuem um perfil terapêutico superior ao dos estrógenos e ainda que produtos naturais encontrados em plantas podem constituir uma excelente alternativa para o tratamento de inúmeras condições patológicas como a osteoporose, a doença cardiovascular e o diabetes mellitus (Maciel, Pinto et al. 2000).

Uma revisão na literatura recente nos revela que diferentes substâncias isoladas de plantas, pertencentes a várias classes químicas exibem promissora atividade antiinflamatória por interagirem com importantes alvos celulares principalmente, por controlarem a expressão de genes pró-inflamatórios envolvidos na gênese e manutenção da inflamação (Calixto, Otuki et al. 2003). Como exemplos de substâncias derivadas de plantas com ação antiinflamatória, podem-se citar: resveratrol (**19**), encontrado em diversas espécies de uva (Akiyama, Barger et al. 2000), curcumina (**20**), encontrada no açafrão-*Curcuma longa*- (Srivastava, Bordia et al. 1995) e silimarina (**21**), encontrada no cardo-santo - *Silybum marianum* - (Middleton, Kandaswami et al. 2000).



Estima-se que aproximadamente somente 5 a 15% de um total de 250.000 espécies de plantas superiores tenham sido sistematicamente investigadas para a presença de compostos bioativos (Cragg and Newman 1999), o que demonstra a importância de ser dada continuidade a esses estudos (Alexandrova, Alexandrov et al. 2000).

1.8 - ESPÉCIE ESTUDADAS

- ✓ *Morus nigra* L
- ✓ *Pouteria torta* (Mart.) Radlk
- ✓ *Plectranthus ornatus* Codd
- ✓ *Ipomoea cairica* (L.) Sweet

1.8.1. MORUS NIGRA L



Fontes: 1- www.ruhr-uni-bochum.de; 2- www.mistelten.dk; 3- www.wsl.ch

A família *Moraceae*, comum nas regiões tropicais e subtropicais dos cinco continentes, subdivide-se em cerca de sessenta gêneros, os quais abrangem em torno de mil e quatrocentas espécies (Nomura and Hano 1994). Dentre esses gêneros, destacam-se *Morus*, *Fícus* e *Artocarpos*.

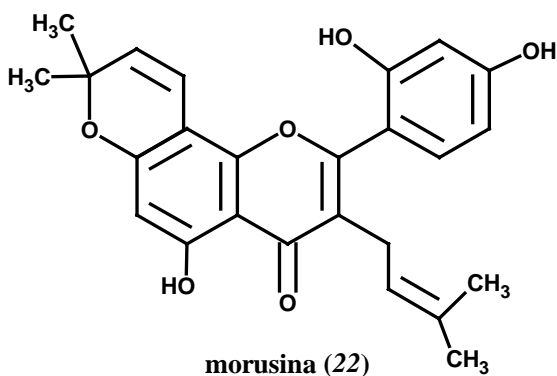
Há um grande interesse no estudo estrutural e farmacológico dos compostos fenólicos isoprenóides substituídos (os flavonóides), os quais são encontrados em várias espécies da família *Moraceae* (Nomura and Hano 1994).

Uma espécie muito popular dessa família é a *Morus nigra* L, conhecida, não somente pelos valores nutricionais de seus frutos - as amoras - como também por conter

vários compostos com ação terapêutica, não apenas em seus frutos, mas também em outras partes dessa planta.

As cascas das árvores, os frutos e as folhas de *Morus nigra* são largamente utilizados na medicina popular. Os frutos são usados para controlar processos inflamatórios e estancar sangramentos, as cascas para amenizar dores dentárias e as folhas como antídoto para envenenamento decorrente de picadas de animais peçonhentos (Naderi, Asgary et al. 2004). O suco da fruta é usado para controlar diabetes mellitus do tipo II (Mincu, Ionescu-Tirgoviste et al. 1989) e inflamações de garganta, língua e boca (Quer 1995).

O prenilflavonóide morusina (22), substância encontrada na *M. nigra*, foi relacionado com a atividade antinociceptiva ou analgésica apresentada por essa espécie (de Souza, Bittar et al. 2000).



Extrato alcóolico de folhas de *Morus nigra* provocou redução da glicose sérica em ratos nos quais o diabetes foi induzido experimentalmente, mas não teve ação em ratos normais. Além disso, o extrato não mudou os níveis de insulina nos ratos diabéticos e normais (Oryan, Eidi et al. 2003).

Estudos têm demonstrado ainda que a fruta da *Morus nigra*, a amora, tem ação protetora contra danos oxidativos para biomoléculas e biomembranas (Naderi, Asgary et al. 2004).

No Brasil, chá de folhas de amora é largamente usado na medicina popular como repositor hormonal durante a menopausa e também para aliviar seus sintomas (principalmente os fogachos), além de amenizar os sintomas de cefaléia e irritação que ocorrem no período pré-menstrual.

1.8.2. *POUTERIA TORTA* (MART.) RADLK



Fonte: www.tradewindsfruit.com

O Cerrado do Brasil possui uma flora rica (Burman 1991), sendo que muitas espécies presentes nesse bioma são usadas na medicina popular para o tratamento de várias patologias. Dentre essas podem ser citadas a *Pouteria torta* (Sapotaceae), conhecida popularmente como guapeva, curiola, guapebeira, acá ferro, abiu piloso, abiu do cerrado e grão de galo. Essa espécie é apreciada pela população local por seus frutos comestíveis e também devido as cascas de seu tronco serem usadas na medicina popular como antidiarréico.

Pouco se conhece quanto à composição micromolecular da *P. torta*. Dos extratos hexânico e diclorometânico de flores e frutos de *Pouteria torta*, foram isolados ácidos graxos, poliisoprenóides, triglicerídeos, hidrocarbonetos normais e ramificados, esteróides, triterpenos penta e tetracíclicos (David 1993).

Estudos recentes indicam que o gênero *Pouteria* possui substâncias com atividade biológica. O extrato metanólico de folhas de *P. torta* apresenta atividade contra *Cladosporium sphaerospermum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Alves, Silva et al. 2000). Extratos de *Pouteria* sp apresentaram atividades de inibição de α -amilase em saliva humana (Albuquerque, Bortolini Jr. et al. 2002) e de ação antinociceptiva (Chagas, Bittencourt et al. 2003).

1.8.3. *PLECTRANTHUS ORNATUS* CODD



Fonte: www.mytho-fleurs.com

O gênero *Plectranthus*, pertence à família Lamiaceae (Labiatae) que compreende mais de 300 espécies distribuídas em regiões tropicais da África, Ásia e Austrália e adaptadas a quase todos os *habitats* e altitudes. Muitas dessas espécies apresentam interesse econômico e medicinal (Codd 1985; Abdel-Mogib, Albar et al. 2002).

Várias espécies desse gênero são usadas na medicina popular para diversos fins terapêuticos, apesar da existência limitada de informações farmacológicas e fitoquímicas acerca dessas plantas (Dellar, Cole et al. 1996).

Em uma revisão etnobotânica do gênero *Plectranthus*, foram citadas quinze espécies utilizadas para o tratamento de diversas infecções e febre (Lukhoba, Simmonds et al. 2006).

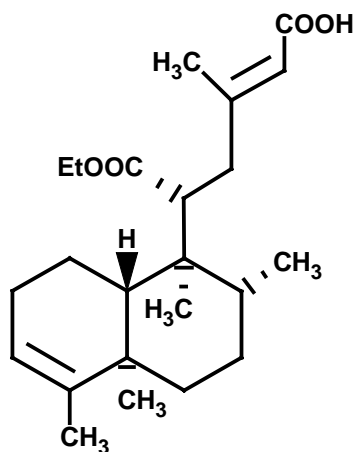
Para as espécies *P. barbatus* e *P. amboinnicius* são descritos vários usos populares, sendo atribuído a essas duas espécies 68% de todos os usos tradicionais descritos para o gênero *Plectranthus* (Lukhoba, Simmonds et al. 2006).

A espécie *Plectranthus ornatus* é uma erva perene e suculenta, de aroma desagradável, que cresce entre rochas, preferencialmente à sombra. É comumente usada como planta ornamental nos jardins brasileiros, sendo conhecida popularmente como

boldinho, boldo-rasteiro, boldo gambá e boldo-de-folha-miúda.

As folhas de *P. ornatus* são utilizadas no tratamento de problemas de estômago (hipossecrator gástrico) e de doenças relacionadas ao fígado como alternativa ao *P. barbatus* (falso-boldo), também utilizado para o mesmo fim terapêutico. São igualmente utilizadas com finalidades diurética, antipirética, analgésica, antibiótica e antiinflamatória peitoral (Corrêa, Batista et al. 1998).

Testes preliminares demonstraram que o diterpeno ácido 11*R**-acetoxicolavênico (**23**), isolado do extrato hexânico, e o extrato hidroetanólico bruto, ambos das folhas de *P. ornatus*, apresentaram atividade antinociceptiva (teste de nocicepção induzido por formalina em camundongos). (Oliveira, Ferreira et al. 2005).



ácido 11*R-acetoxicolavênico (23)**

1.8.4. *IPOMOEA CAIRICA* (L.) SWEET



Fonte: homepage1.nifty.com

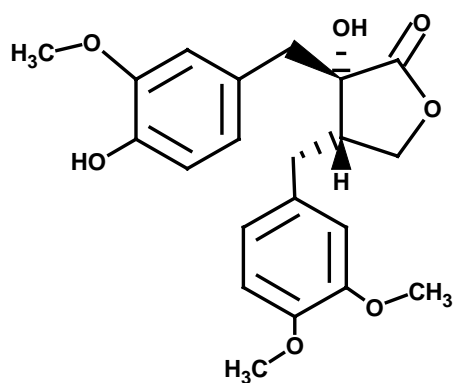
A família Convolvulaceae possui cerca de 60 gêneros, com mais de 1800 espécies. A literatura descreve o isolamento de diversas classes de fitoconstituintes nessa família, dentre os quais podem ser citados policetídeos, terpenóides, esteróides, flavonóides, xantonas, alcalóides, lignanas e, mais recentemente, glicolipídeos e ésteres de oligossacarídeos (Lima and Braz-Filho 1997).

A espécie *Ipomoea cairica* (L.) Sweet, pertencente à família Convolvulaceae e conhecida popularmente no Brasil como corda-de-viola, é uma planta trepadeira, sendo considerada por muitos como uma espécie invasora (Procópio, Ferreira et al. 2003). Ela cresce em regiões tropicais e subtropicais do planeta.

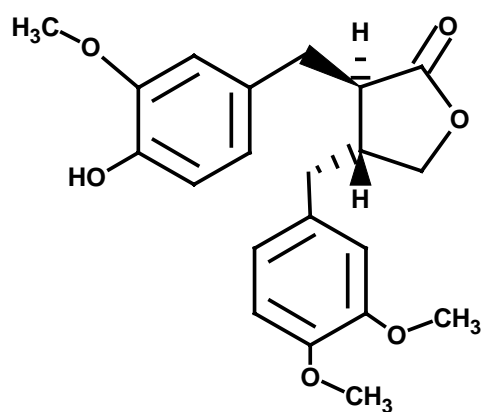
Há vários relatos do uso de *Ipomoea cairica* na medicina popular a infusão feita com as folhas e as raízes dessa espécie é utilizada no tratamento de erupções cutâneas, especialmente aquelas acompanhadas por febre (Alonso 1988; Thomas, Rao et al. 2004). As raízes são utilizadas para o tratamento da hepatite e para o estímulo de ações purgativas

(Alonso 1988). As partes aéreas da planta são utilizadas como antiinflamatório e anti-reumático (Franco 1997).

Alguns compostos isolados de *I. cairica* mostraram-se eficientes quando submetidos a testes biológicos. O óleo essencial dessa espécie apresentou propriedades larvicidas contra *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* (Thomas, Rao et al. 2004). As lignanas, (-)-traquelogenina (**24**) e (-)-arctigenina (**25**), apresentaram inibição da replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1; cepas HTLV-III B) *in vitro* (Schroder, Merz et al. 1990) e atividade antagonista de Ca^{2+} (Paska, Innocenti et al. 2002).



traquelogenina (**24**)



arctigenina (**25**)

2. OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Estudar a atividade de extratos de *Morus nigra*, *Pouteria torta*, *Plectranthus ornatus* e *Ipomoea cairica* e substâncias isoladas das espécies *Plectranthus ornatus* e *Ipomoea cairica* na ativação de receptores nucleares.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade dos extratos vegetais das espécies *Morus nigra*, *Plectranthus ornatus*, *Pouteria torta* e *Ipomoea cairica* e substâncias isoladas de *Plectranthus ornatus* e *Ipomoea cairica* sobre a maquinaria transcricional das células U937 transfectadas.

- Investigar se os extratos vegetais das espécies *Morus nigra*, *Plectranthus ornatus*, *Pouteria torta* e *Ipomoea cairica* e as substâncias isoladas de *Ipomoea cairica* são capazes de aumentar a atividade transcricional dos receptores de estrogênio (ER α e ER β), comparando a resposta obtida com a adição dos extratos vegetais ou das substâncias isoladas com a resposta observada com a adição do seu ligante natural.

- Investigar a capacidade dos extratos vegetais das espécies *Morus nigra*, *Plectranthus ornatus*, *Pouteria torta* e *Ipomoea cairica* e das substâncias isoladas de *Ipomoea cairica* de antagonizarem a estimulação dos receptores de estrogênio (ER α e ER β) por seu hormônio natural.

- Investigar se os extratos vegetais e substâncias isoladas da espécie *Plectranthus ornatus* são capazes de aumentar a atividade transcricional do receptor de glicocorticóide (GR), comparando a resposta obtida com a adição dos extratos vegetais e das substâncias isoladas com a resposta observada com a adição do hormônio natural.

- Investigar se os extratos vegetais e substâncias isoladas da espécie *Plectranthus ornatus* são capazes de antagonizarem a estimulação do receptor de glicocorticóide (GR) por seu hormônio natural.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - CULTURA DE CÉLULAS, REAGENTES E PLASMÍDEOS

Para o ensaio de gene repórter e transfecção, foram utilizadas células U937 (pró-monócitos humanos) obtidas do Centro de Cultura de Células da Universidade da Califórnia, em São Francisco (UCSF - EUA). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO), contendo 10% de soro bovino fetal (GIBCO) com 2 mM de glutamina (SIGMA), 50 U/mL de penicilina (SIGMA) e 50 µg/mL de estreptomicina (SIGMA) e mantidas em uma incubadora a 37^oC com 5% de CO₂. Os ligantes utilizados como controles positivos, dexametasona e 17β-estradiol (SIGMA), foram diluídos em dimetilsulfóxido:etanol, 2:3 (DMSO:EtOH).

Os plasmídeos de expressão utilizados nos ensaios de transfecção foram: CMV-ER α , CMV-ER β e RSV-GR. Esses plasmídeos contêm as seqüências de cDNA que codificam os respectivos receptores, sob o controle dos promotores do citomegalovírus (CMV) ou do Rous Sarcoma vírus (RSV), conforme indicado. Foi também utilizado o plasmídeo Gal-ER β que contém o domínio de ligação ao DNA (DBD) da β -galactosidase associado ao domínio de ligação ao hormônio (LBD) do ER β .

Os plasmídeos-repórter usados nos ensaios contêm o elemento responsivo para os ER e GR, clonados acima do promotor mínimo (-32/+45) da timidina quinase (tk). Esse elemento responsivo está ligado à seqüência que codifica o gene repórter luciferase, resultando nas construções: ERE-Luc e GRE-Luc.

Nos ensaios que utilizaram o Gal-ER β , adotou-se o plasmídeo repórter Gal-Luc, que possui o elemento responsivo do fator de transcrição da β -galactosidase (Gal), também ligado à seqüência que codifica o gene repórter luciferase.

Além disso, o promotor do citomegalovírus foi fusionado ao gene que codifica a enzima luciferase (CMV-luc), gerando um plasmídeo que produz luciferase constitutivamente. Esse plasmídeo foi utilizado para avaliar se os extratos e substâncias isoladas induziriam mudanças nos níveis transcricionais da luciferase. Quando os extratos e substâncias forem capazes de induzirem uma diminuição na produção de luciferase, serão entendidos como tóxicos às células U937. Todos os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. John Baxter da Universidade da Califórnia, em São Francisco (UCSF), EUA.

3.2 - TRANSFECCÃO E ENSAIO DE GENE REPÓRTER

Os ensaios de transfecção e de gene repórter são métodos utilizados na pesquisa e identificação de ligantes para receptores nucleares (Chiellini, Apriletti et al. 1998). São também utilizados na pesquisa de possíveis ligantes presentes em extratos de plantas (New and Miller-Martini 2003) (Moore, Goodwin et al. 2000). O ensaio de transfecção consiste na inserção do plasmídeo repórter e do plasmídeo de expressão do receptor nuclear de interesse no núcleo das células (Forman, Tontonoz et al. 1995). A inserção dos plasmídeos no núcleo das células U937 foi realizada por meio de choque elétrico (eletroporação). Após a transfecção, as células foram tratadas com os ligantes, com os extratos ou com as substâncias isoladas dos extratos em estudo.

As células U937 foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 3 minutos e suspensas (10 milhões) em 0,5 mL de solução de PBS contendo 0,1% de dextrose. Estas células foram, a seguir, misturadas a 3 µg do plasmídeo repórter e 2 µg do vetor de expressão do receptor nuclear e interesse. As células, com os respectivos plasmídeos, foram então transferidas para uma cuveta própria e eletroporadas utilizando-se um gerador de pulso Bio-Rad com voltagem de 300 mV e 950 µF de capacitância. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em meio RPMI, distribuídas em placas de 12 poços e tratadas com o veículo utilizado (DMSO:EtOH-2:3), com o ligante natural para o receptor nuclear em estudo, com os extratos e com as substância isoladas pesquisadas.

Após 24 horas, as células foram coletadas por centrifugação (13000 rpm por 3 minutos). O sobrenadante foi aspirado e descartado. Ao precipitado celular formado foram adicionados 150µL do tampão de lise 1X (Promega). O lisado celular (20µL) foi misturado com 20µL do substrato para a enzima luciferase (luciferina) (Luciferase Assay System, Promega). A emissão de luz resultante da reação enzimática entre a luciferase e luciferina foi quantificada em um luminômetro (Turner Designs Inst. Mod TD-20/20).

Substâncias com atividade agonista se ligar-se-ão ao receptor nuclear ativando a maquinaria transcricional e como resultado, haverá a transcrição do gene repórter luciferase. Substâncias com atividade antagonista, após ligarem-se ao receptor nuclear, reprimirão a maquinaria transcricional, impedindo a transcrição do gene repórter luciferase.

Os extratos e as substâncias isoladas das espécies estudadas foram primeiramente investigados quanto à sua possível interferência na maquinaria transcricional das células

U937 transfectadas. Para tal, foi realizada uma transfecção utilizando um plasmídeo que contém o gene repórter luciferase dirigido pelo promotor do citomegalovírus (CMV-Luc).

O promotor do citomegalovírus é ativado constitutivamente em células humanas. A fusão desse promotor com o gene que codifica a enzima luciferase (CMV-Luc) gerou um plasmídeo que produz luciferase de modo constitutivo. A diminuição na transcrição da luciferase será entendida como um efeito tóxico da substância adicionada para as células. Extratos e substâncias isoladas que causaram esse efeito não foram utilizados nos estudos posteriores de transfecção com receptores nucleares.

Para o ensaio de transfecção os extratos, as substâncias isoladas de extratos e os hormônios utilizados foram ressuspensos com dimetilsulfóxido:etanol 2:3 (DMSO:EtOH).

3.3. CÁLCULO DA TAXA DE ATIVAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO

A taxa de ativação da transcrição é a razão entre a atividade (leitura da luciferase) das células tratadas com os agonistas (controle positivo), ou extratos, ou substâncias isoladas sobre a atividade (leitura da luciferase) das células tratadas com o veículo (DMSO:EtOH). Assim tem-se que a taxa de ativação das células tratadas com o veículo é igual a um (1). Os dados representam as médias de no mínimo três experimentos realizados e cada um em triplicata.

$$\text{Taxa de ativação} = \frac{\text{Leitura da Luciferase (ligante natural ou extrato ou substância isolada)}}{\text{Leitura da Luciferase (células tratadas com o veículo)}}$$

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os gráficos apresentados foram feitos através do programa Prisma 3.0 (GraphPad Software, Inc.). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada pelo mesmo programa. A análise de variância a 5% (ONE-WAY-ANOVA) foi seguida por Newman-Keuls Multiple Comparison. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

3.5.1. Extratos de *Morus nigra* L

Folhas de amora (*Morus nigra*) foram coletadas no mês de março de 2004 em Brasília, Distrito Federal, Brasil. Uma exsicata está depositada no Herbário da Universidade de Brasília - UB e a espécie foi identificada pela professora Carolyn Elinore Barnes Proença (número de registro UnB-Franzotti E. – 17837).

As folhas de *Morus nigra* foram secadas e trituradas até atingir a consistência de pó. Parte desse material (350g) foi macerada por 7 dias, utilizando como solvente primeiro hexano seguido de etanol. Cada extração foi repetida 3 vezes. Após filtração, os solventes foram removidos utilizando evaporador rotativo, sendo obtido 9,3g do extrato hexânico (AH) e 15,2g do extrato etanólico (AEtOH). O fluxograma de obtenção dos extratos hexânico e etanólico de *Morus nigra* é apresentado na **Figura 8**.

O extrato aquoso foi obtido por infusão, usando água destilada, a partir de 54g de folhas trituradas. Após filtração, a água foi removida por técnica de liofilização, sendo obtido 2,1g de extrato aquoso bruto (AAq).

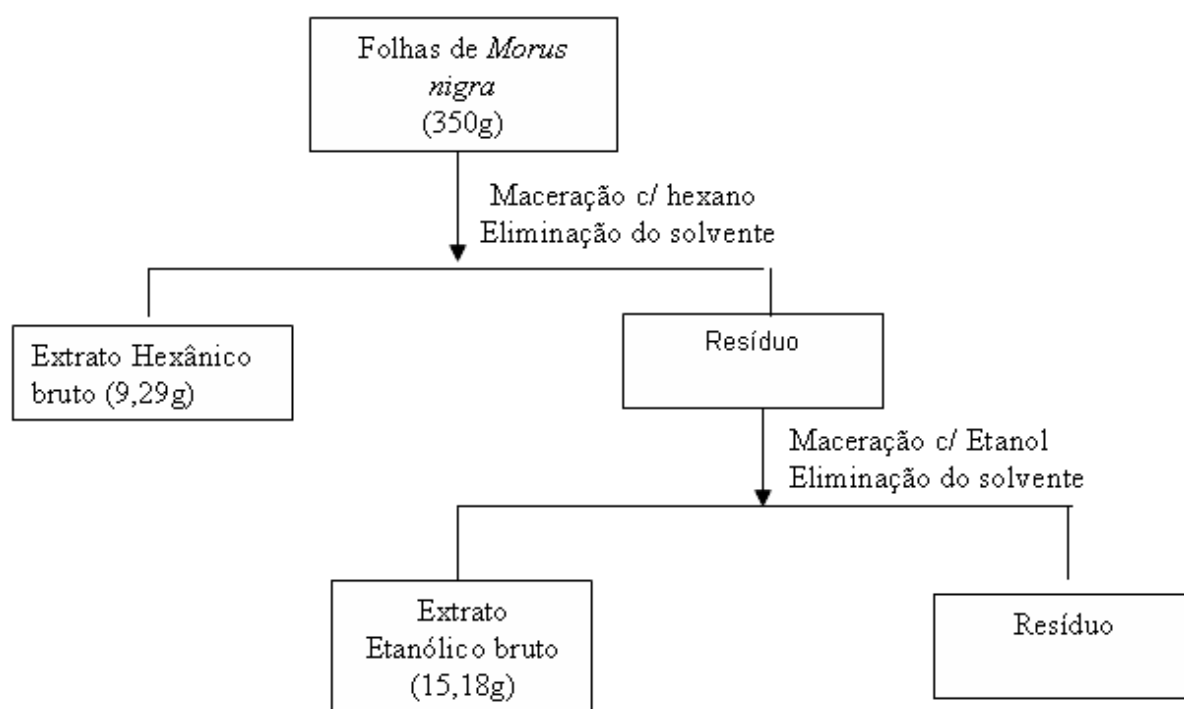


Figura 8. Obtenção dos extratos de *Morus nigra* L

3.5.2. Extratos de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk

Os extratos de *P. torta* foram fornecidos pela Profa. Dâmaris Silveira, da Faculdade de Ciências da Saúde, UnB.

Folhas de *Pouteria torta* foram coletadas no campus da Universidade de Brasília no mês de julho de 2003. Uma exsicata está depositada no Herbário da Universidade de Brasília e a espécie foi identificada pelo Prof. José Elias de Paula (JElías de Paula 3674).

O material vegetal foi secado à temperatura ambiente e pulverizado. Parte desse material (918,0g) foi macerada por 7 dias, primeiramente com hexano, seguido por etanol. As extrações foram repetidas 3 vezes. Após a filtração, os solventes foram removidos sob pressão reduzida, à temperatura inferior a 40°C, tendo sido obtidos 46,0g do extrato hexânico (PTH) e 101,0g do extrato etanólico (PTEtOH).

O extrato aquoso foi obtido por infusão (400,0g de material triturado) utilizando água destilada (3,0L). Após a filtração, a água foi removida por liofilização, resultando em 44,0g de extrato aquoso bruto (PTAq). O fluxograma de obtenção dos extratos é apresentado na **Figura 9**.

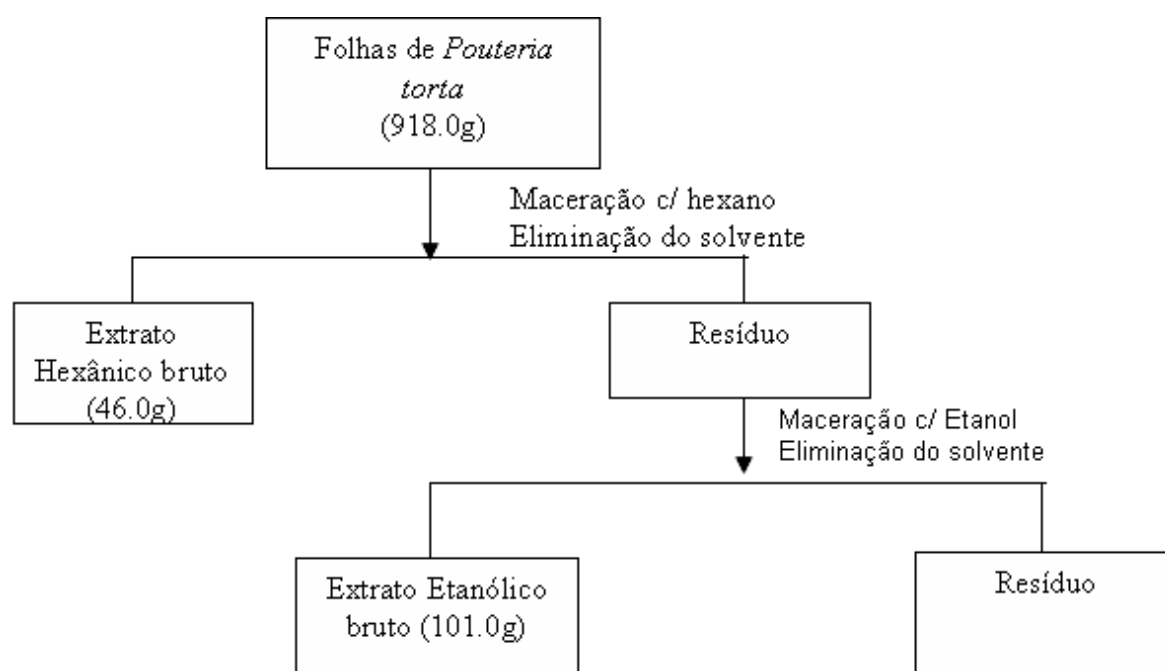


Figura 9. Obtenção dos extratos de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk

3.5.3. Extratos e diterpenos isolados de *Plectranthus ornatus* Codd

Os extratos e substâncias isoladas foram fornecidos pelo Prof. Délio Soares Raslan do Departamento de Química, ICEX, UFMG.

Partes aéreas de *P. ornatus* foram coletadas no mês de setembro de 2002, em Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil, e posteriormente identificadas. Uma exsicata está depositada no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ref. nº. BHCB 57175).

O material botânico seco e triturado (3,8kg) foi sucessivamente extraído por hexano seguido da mistura etanol:água (9:1). Após filtração e evaporação dos solventes por pressão reduzida a temperatura abaixo de 40°C, foram obtidos 38,0g do extrato hexânico bruto (POH) e 114,6g do extrato etanólico bruto (POEtOH). O fluxograma de obtenção dos extratos está apresentado na **Figura 10**.

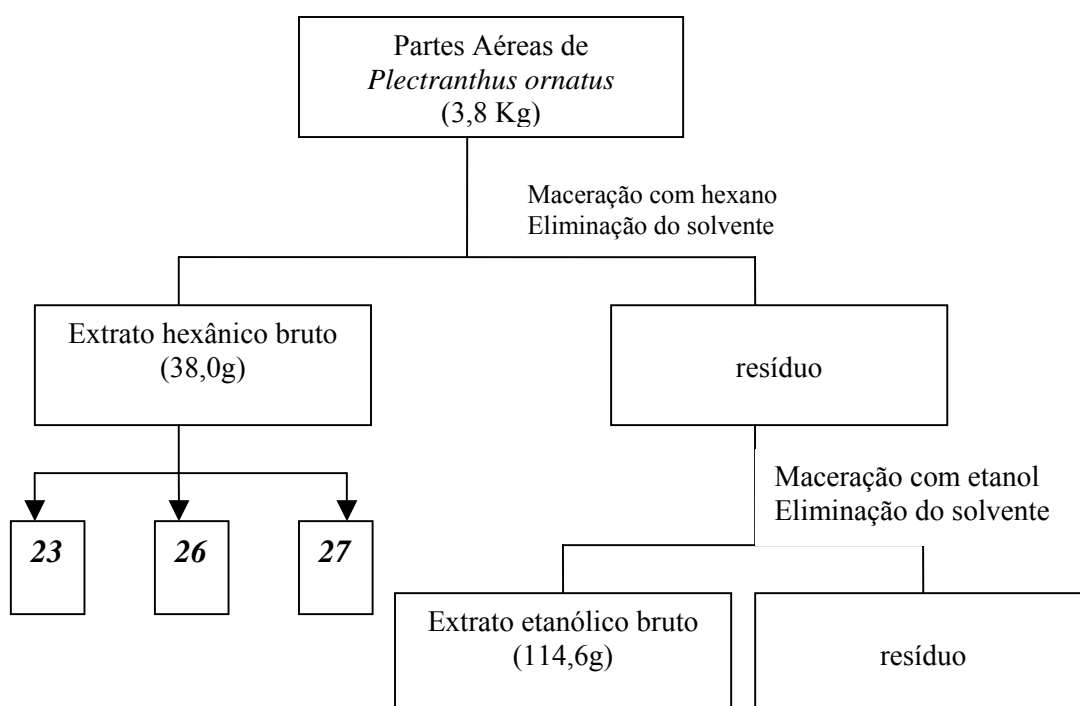
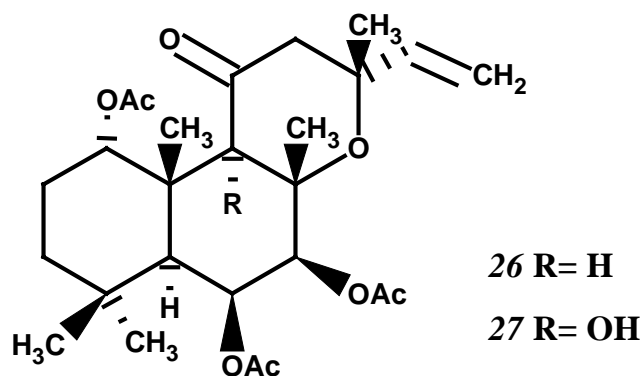


Figura 10. Obtenção dos extratos de *Plectranthus ornatus* Codd

Parte do extrato hexânico bruto foi fracionada e foram obtidos os diterpenos: ácido 11*R**-acetoxicolavênico (**23**), 1 α ,6 β ,7 β -triacetoxi-8,13*R**-epoxi-14-labden-11-ona (**26**), 1 α ,6 β ,7 β -triacetoxi-9-hidroxi-8,13*R**-epoxi-14-labden-11-ona (**27**).



3.5.4. Extrato e substâncias isoladas de *Ipomoea cairica* (L) Sweet

O extrato e as substâncias isoladas foram fornecidos pelo Prof. Délio Soares Raslan, do Departamento de Química, ICEX, UFMG.

Partes aéreas de *I. cairica* foram coletadas no mês de maio de 2000 na cidade de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. A espécie foi identificada pela Profa. Beatriz Gonçalves Brasileiro e uma exsicata (nº. BHCB 16525) está depositada no Herbário do Museu de História Natural do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.

O material botânico (3,3kg) foi seco à temperatura ambiente, pulverizado em moinho de facas e macerado em etanol por sete dias. Após filtração e destilação do solvente, foram obtidos 250,0 g do respectivo extrato bruto. O esquema de obtenção do extrato bruto de *I. cairica* é apresentado na **Figura 11**.

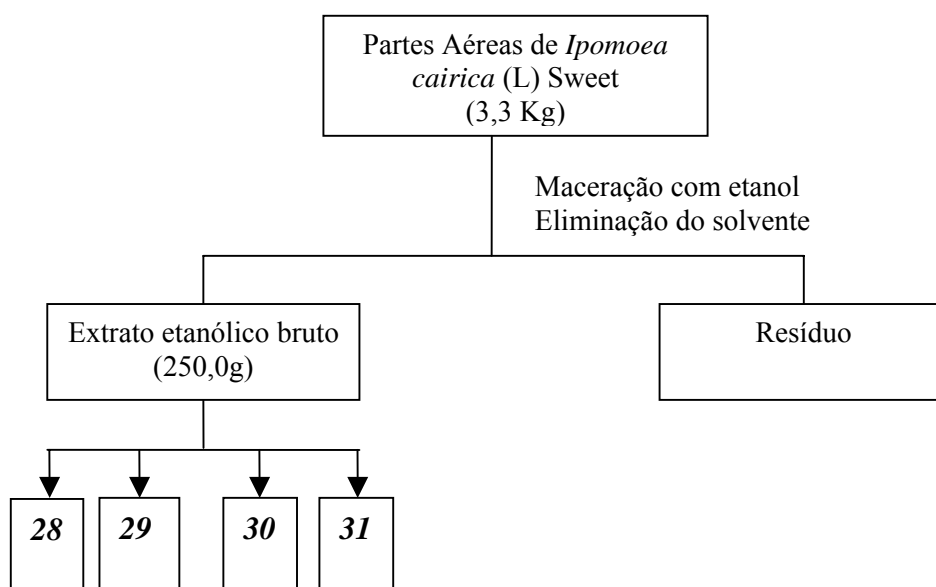
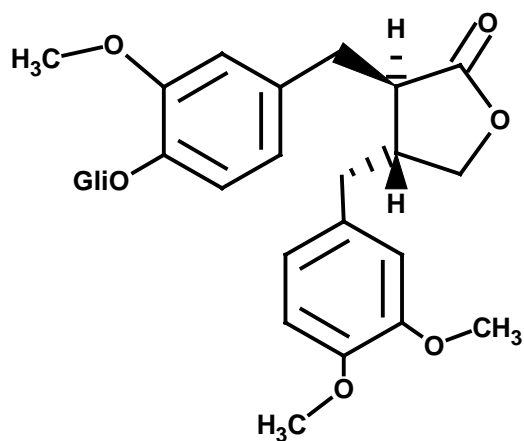
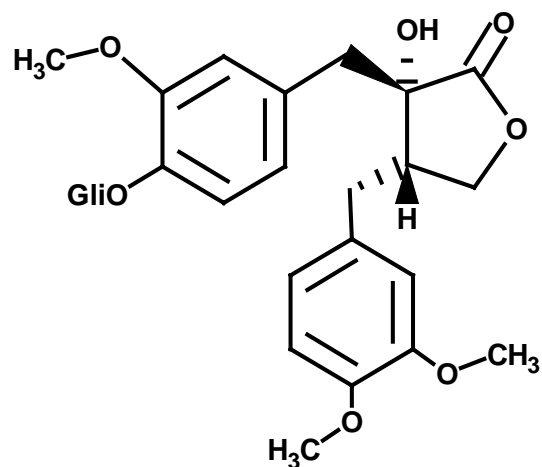


Figura 11. Obtenção do extrato de *Ipomoea cairica* (L) Sweet

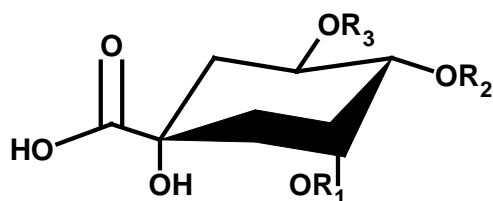
Parte do extrato etanólico (100,0g) foi submetida à partição. Foram obtidos 94,0 mg de 4'-*O*-glicopiranosídeo da arctigenina (**28**), 320,0 mg de 4'-*O*-glicopiranosídeo da traquelogenina (**29**), 36 mg de ácido 4,5-di-cafeoilquínico (**30**) e 9 mg de ácido 3,5-di-cafeoilquínico (**31**).



glicosídeo de arctigenina (**28**)

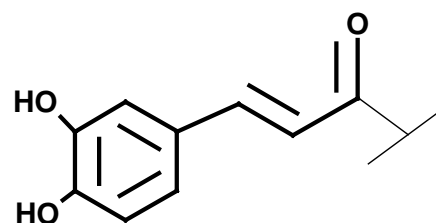


glicosídeo de traquelogenina (**29**)



(**30**) R1 = H; R2=R3 = cafeoíla

(**31**) R1=R3 = cafeoíla; R2 = H



cafeoíla

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *MORUS NIGRA* (L)

A menopausa é definida pela diminuição da função ovariana (com conseqüente declínio da produção de estrogênio e do progesterona e aumento dos hormônios folículo-estimulante–FSH e luteinizante-LH) e tem por característica principal a parada das menstruações (Mayo 1999).

Os sintomas da menopausa são tratados convencionalmente com estrógenos sintéticos. O estrogênio apenas, ou associado com a progesterona, tem sido usado na terapia de reposição hormonal (TRH) nos últimos 25 anos (Lupu, Mehmi et al. 2003). Os efeitos biológicos do estrogênio são mediados pelos receptores de estrogênio alfa e beta que pertencem à superfamília dos receptores nucleares (Bjornstrom and Sjoberg 2004).

A experiência clínica tem demonstrado que a terapia de reposição hormonal com estrogênio em mulheres pós-menopausadas pode aumentar o risco de ocorrência de eventos tromboembólicos e câncer de mama (Rossouw, Anderson et al. 2002). Terapias que não estimulem a proliferação de células da mama podem ser extremamente úteis para o tratamento dos sintomas da menopausa em mulheres com alto e baixo risco para desenvolvimento de câncer de mama (Curcio, Kim et al. 2005).

Em muitas regiões do Brasil, o chá de folhas de *M. nigra* é utilizado como uma alternativa natural para a terapia de reposição hormonal e tratamento dos sintomas da menopausa, principalmente os fogachos. Entretanto, nenhum efeito é conhecido de *M. nigra* sobre o receptor de estrogênio.

Considerando os dados acima relatados, decidiu-se avaliar se extratos de amora poderiam ter um efeito sobre os receptores de estrogênio.

Foram utilizados nesse estudo os extratos aquoso (AAq), etanólico (AEtOH) e hexânico (AH), preparados a partir das folhas de *Morus nigra*.

Os extratos e os controles positivos estradiol (E₂) e genisteína (conhecidas substâncias com atividade agonista para os receptores de estrogênio) utilizados nos ensaios de transfecção e de gene repórter foram diluídos com o veículo dimetilsulfóxido:etanol 2:3.

4.1.1. Estudo do efeito tóxico dos extratos de *Morus nigra* para as células U937.

O controle da atividade tóxica dos extratos de *M. nigra* para as células U937 foi realizado utilizando a metodologia de transfecção com o plasmídeo CMV-Luc.

Como pode ser observado na **Figura 12**, a adição dos extratos aquoso (AAq) e hexânico (AH) das folhas de *Morus nigra* na concentração de 40µg/mL não apresentou toxicidade para as células U937. No entanto, a adição do extrato etanólico (AEtOH - 40µg/mL) induziu uma diminuição na expressão gênica do CMV-luciferase sugerindo a presença de alguma substância, nesse extrato, com ação tóxica para as células U937.

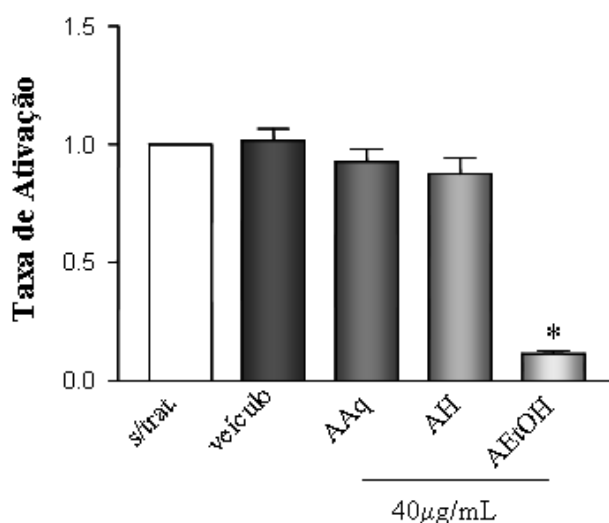


Figura 12. Efeito tóxico do extrato etanólico (AEtOH) de *Morus nigra* (40µg/mL) para as células U937. Células U937 foram transfectadas com 3µg do plasmídeo repórter luciferase conduzido pelo promotor constitutivo do citomegalovírus (CMV-Luc) e tratadas com o veículo (DMSO/EtOH 2:3) e os extratos aquoso (AAq), hexânico (AH) e etanólico (AEtOH) na concentração de 40µg/mL. Um grupo de células foi mantido sem tratamento (controle positivo). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos. (* $P < 0,001$ vs sem tratamento)

O efeito de diminuição na expressão gênica do CMV-luciferase, induzido pelo extrato etanólico de folhas de *Morus nigra*, foi observado não somente na concentração de 40µg/mL, mas também nas concentrações de 10, 20 e 30µg/mL (**Figura 13**). Por essa razão, o extrato etanólico não foi usado nos experimentos posteriores com os receptores de estrogênio.

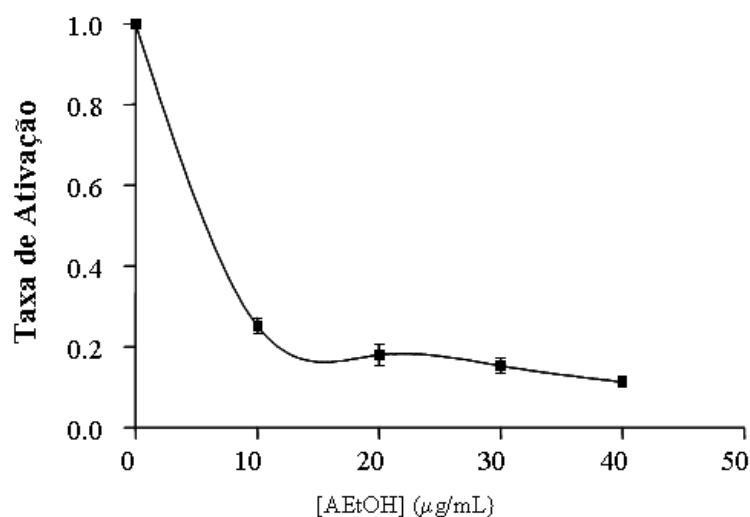


Figura 13. Curva dose-resposta do extrato etanólico de *Morus nigra*. Células U937 foram transfectadas com 3µg do plasmídeo repórter luciferase conduzido pelo promotor constitutivo do citomegalovírus (CMV-Luc). As células foram tratadas com doses crescentes do extrato etanólico de folhas de *Morus nigra* (10, 20, 30 e 40µg/mL). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos.

4.1.2. Estudo do efeito agonista de extratos de *Morus nigra* sobre a atividade transcricional mediada pelos ERα e ERβ

Posteriormente, foi investigada a ação do extrato aquoso e do extrato hexânico das folhas de *Morus nigra* sobre a atividade transcricional mediada pelo receptor de estrogênio alfa. Como mostrado na **Figura 14**, quando comparado com o veículo, os controles positivos estradiol (E₂) ou genisteína promoveram um aumento na atividade transcricional de $2,2 \pm 0,21$ e $2,1 \pm 0,17$ vezes, respectivamente ($P < 0,001$ vs veículo). Entretanto, os extratos aquoso (AAq) e hexânico (AH) de *Morus nigra*, na concentração de 40µg/mL, não aumentaram a atividade transcricional mediada pelo ERα ($P > 0,05$ vs veículo). Estes resultados mostram que, nas condições acima descritas, os extratos de *Morus nigra* (AAq e AH) não possuem efeito agonista sobre o ERα.

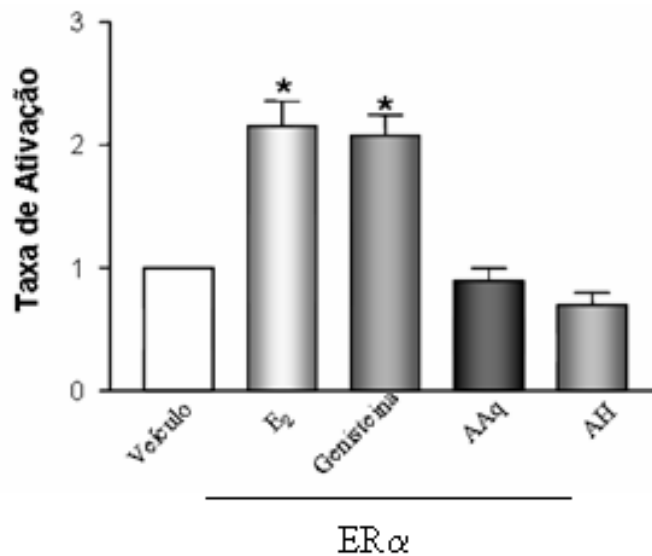


Figura 14. Ausência de ação agonista dos extratos aquoso e etanólico de *Morus nigra* sobre o ER α . Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do plasmídeo de expressão para ER α e com 3 μ g do plasmídeo que contém o elemento responsivo para o ER ligado ao gene repórter da luciferase - ERE-Luc. As células foram tratadas com veículo (DMSO: EtOH), controles positivos (estradiol 10⁻⁷ mol/L e genisteína 10⁻⁶ mol/L) e os extratos aquoso (AAq) e hexânico (AH) de *Morus nigra* (40 μ g/mL). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. * $P < 0,05$ vs veículo.

Similar resultado foi observado quando investigado o efeito de AAq e AH sobre a atividade transcricional mediada pelo receptor de estrogênio beta (**Figura 15**). Os grupos de células tratados com E₂ e genisteína tiveram um aumento na atividade do gene repórter em 2,53 \pm 0,26 e 2,11 \pm 0,31 vezes, respectivamente ($P < 0,05$ vs veículo) e os extratos de *Morus nigra* (AAq e AH), na concentração de 40 μ g/mL, não aumentaram a atividade transcricional mediada pelo ER β ($P > 0,05$ vs veículo).

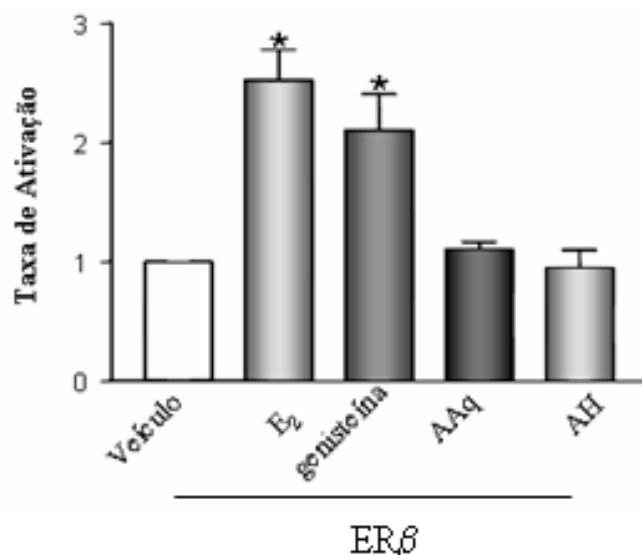


Figura 15. Ausência de ação agonista dos extratos aquoso e etanólico de *Morus nigra* sobre o ER β . Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do plasmídeo de expressão para ER β e com 3 μ g do plasmídeo que contém o elemento responsivo para o ER ligado ao gene repórter da luciferase - ERE-Luc. As células foram tratadas com veículo (DMSO: EtOH), com controles positivos (estradiol 10⁻⁷mol/L e genisteína 10⁻⁶mol/L) e com extratos aquoso (AAq) e hexânico (AH) de *Morus Nigra* (40 μ g/mL). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam à média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. (* $P < 0,05$ vs veículo)

4.1.3. Estudo do efeito antagonista de extratos de *Morus nigra* sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β

Como os extratos aquoso e hexânico de *Morus nigra* não apresentaram efeito agonista, foi investigado se esses extratos poderiam ter algum efeito antagonista para os receptores de estrogênio alfa e beta.

Células U937 tratadas com E₂ ou genisteína, quando comparadas com o veículo, induziram um aumento na atividade transcricional do ER α (2,2 \pm 0,21 e 2,1 \pm 0,17 vezes, respectivamente) ($P < 0,001$ vs veículo). O grupo de células tratadas com o extrato aquoso ou hexânico de *Morus nigra* (40 μ g/mL), na presença do controle positivo estradiol, tiveram um aumento na transcrição de 2,0 \pm 0,22 e 1,8 \pm 0,34 vezes, respectivamente ($P < 0,05$ vs veículo). Não houve diferença estatística em comparação ao controle positivo estradiol.

Esses resultados (**figura 16**) mostram que os extratos aquoso e hexânico de *Morus nigra*, nas condições analisadas, não têm a capacidade de modificar a atividade

transcricional exibida somente com o estradiol, sugerindo que esses extratos não possuem efeito antagonista sobre o receptor de estrogênio alfa.

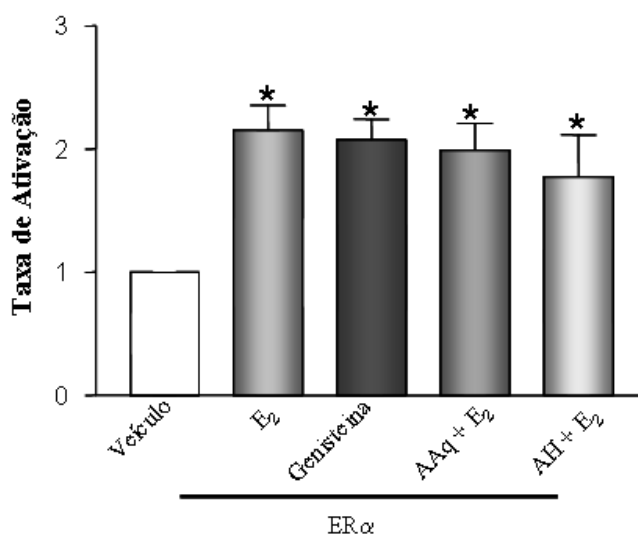


Figura 16. Ausência de efeito antagonista dos extratos aquoso e etanólico de *Morus nigra* sobre o ER α . Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do plasmídeo de expressão para ER α e com 3 μ g do plasmídeo que contém o elemento responsivo para o ER ligado ao gene repórter da luciferase - ERE-Luc. As células foram tratadas com veículo (DMSO:EtOH), com controles positivos (estradiol 10⁻⁷ mol/L e genisteína 10⁻⁶ mol/L) e com extratos AAq e AH (40 μ g/mL) na presença de estradiol (10⁻⁷ mol/L). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. (* $P < 0,05$ vs veículo)

Efeitos similares foram obtidos quando investigado o efeito dos extratos de *Morus nigra* (AAq e AH) sobre a atividade transcricional mediada pelo receptor de estrogênio beta (ER β) (**Figura 17**). O E₂ e a genisteína aumentaram a atividade transcricional do ER β em 2,53 \pm 0,26 e 2,11 \pm 0,31 vezes, respectivamente ($P < 0,05$ vs veículo) e os extratos aquoso e hexânico de *Morus nigra* (40 μ g/mL) na presença de estradiol aumentaram a atividade transcricional em 2,28 \pm 0,29 e 2,43 \pm 0,34 vezes, respectivamente ($P < 0,05$ vs veículo). Não houve diferença estatística entre a taxa de ativação obtida com estradiol e a taxa obtida com estradiol na presença dos extratos.

Portanto, nas condições analisadas nesses experimentos, os extratos aquoso e hexânico de *M. nigra* (40 μ g/mL) também não apresentaram efeito antagonista sobre o receptor de estrogênio beta.

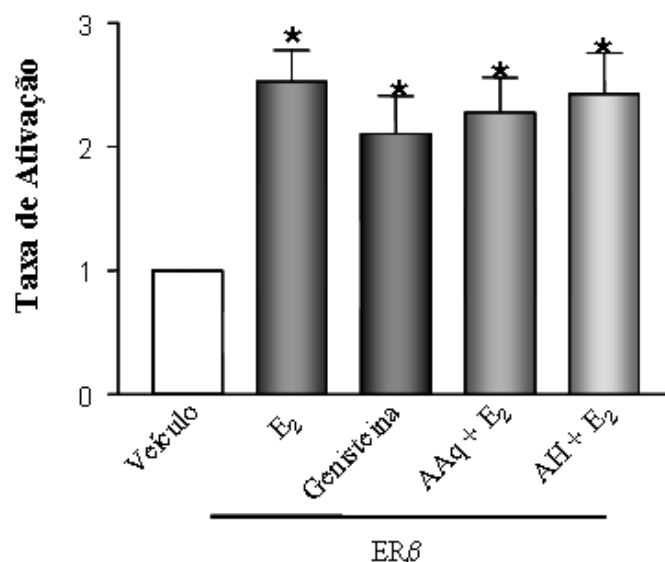


Figura 17. Ausência de efeito antagonista dos extratos aquoso e etanólico de *Morus nigra* o ER β . Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do plasmídeo de expressão para ER α e com 3 μ g do plasmídeo que contém o elemento responsivo para o ER ligado ao gene repórter da luciferase - ERE-Luc. As células foram tratadas com veículo (DMSO:EtOH), com controles positivos (estradiol 10⁻⁷ mol/L e genisteína 10⁻⁶ mol/L) e os extratos AAq e AH (40 μ g/mL) na presença de estradiol (10⁻⁷ mol/L). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. (* $P < 0,05$ vs veículo)

Estes resultados indicam que, nas condições experimentais, os extratos AAq e AH não mostraram efeito agonista ou antagonista sobre os receptores de estrogênio.

Os distúrbios endocrinológicos correlacionados com o fogacho são complexos. O declínio de estradiol é necessário, mas insuficiente para, por si só, explicar a ocorrência dos fogachos nas mulheres menopausadas (Miller 1998).

Os relatos populares das mulheres menopausadas na melhora dos fogachos com a utilização de chá de folhas de *Morus nigra* pode ser relacionada com a ação de substâncias presentes nessa espécie que possuam ação em outro mecanismo que não o estrogênico, visto que, nas condições analisadas, os extratos aquoso e hexânico dessa espécie não tiveram qualquer atividade nos receptores de estrogênio.

4.2. *POUTERIA TORTA* (MART.) RADK

Vários estudos têm indicado a ocorrência de hormônios sexuais de mamíferos (17 β -estradiol, androsterona, testosterona e progesterona) em plantas (Janeczko and Skoczowski 2005).

O cerrado é o segundo maior bioma do Brasil e poucos estudos foram realizados com espécies naturais desse bioma, o que nos motivou a investigarmos a existência de espécies que possam ter substâncias com ação estrogênica. Uma espécie comum do cerrado e com poucos estudos realizados sobre suas possíveis ações biológicas é a *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.

Extratos de diferentes polaridades foram preparados a partir de folhas de *P. torta* e testados quanto ao seu possível efeito estrogênico.

Os extratos aquoso (PTAq), etanólico (PTEtOH) e hexânico (PTH) de *Pouteria torta* foram preparados segundo a metodologia já descrita anteriormente.

O potencial tóxico e estrogênico dos extratos de *P. torta* foram testados utilizando-se as metodologias de transfecção e ensaio de gene repórter em células U937.

O controle positivo estradiol e os extratos de *P. torta* foram diluídos com o veículo DMSO/EtOH (2:3).

4.2.1. Estudo do efeito tóxico dos extratos de *Pouteria torta* para as células U937

Inicialmente foi testado a toxicidade dos extratos de *P. torta* para as células U937. Células U937 foram transfectadas com o plasmídeo CMV-Luc e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH) e os extratos aquoso (PTAq), etanólico (PTEtOH) e hexânico (PTH) (40 μ g/mL). Um grupo de células foi mantido sem tratamento (controle positivo).

Os resultados indicam que o veículo e os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *P. Torta* são atóxicos para as células U937 ($P > 0,05$ vs s/trat.), **Figura 18.**

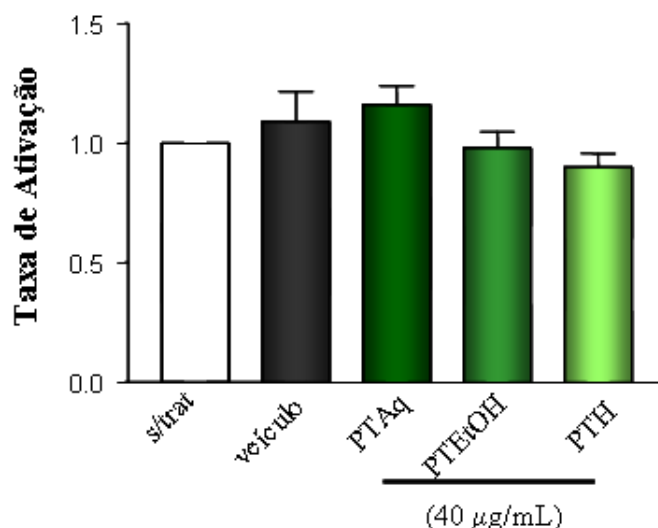


Figura 18. Atoxicidade dos extratos aquoso, etanólico e hexânico de *Pouteria torta* para as células U937. Células U937 foram transfectadas com 3µg do plasmídeo contendo o gene da luciferase conduzido pelo promotor constitutivo do citomegalovírus (CMV-Luc) e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH) e com os extratos PTAq, PTEtOH e PTH (40µg/mL). Um grupo foi mantido sem tratamento (controle positivo). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos. ($P > 0,05$ vs s/trat.)

4.2.2. Estudo do efeito agonista de extratos de *Pouteria torta* sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β

Estudo da composição micromolecular de *P. torta* demonstrou a presença de esteróides nesta espécie (David 1993), o que nos levou a investigar a ação dos extratos aquoso (PTAq), hexânico (PTH) e etanólico (PTEtOH) de folhas de *P. torta* nos receptores de estrogênio (isoformas α e β).

Como mostrado na **Figura 19A** (ER α), células tratadas com com E₂ (controle positivo) tiveram um aumento na atividade transcricional em $3,19 \pm 0,29$ vezes ($P < 0,05$ vs veículo). Os valores de atividade transcricional do ER α obtidos com os grupos de células tratados com os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *P. torta* não apresentaram diferença estatística quando comparados ao valor obtido com o grupo de células tratado somente com o veículo. Portanto, os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *P. torta*, nas condições experimentais, não mostraram ação agonista sobre o ER α ($P > 0,05$ vs veículo).

Na **Figura 19B** (ER β) está mostrado o efeito dos extratos de *P. torta* sobre a atividade transcricional mediada pelo ER β . O estradiol aumentou a atividade do gene repórter em $2,25 \pm 0,12$ vezes ($P < 0,05$ vs veículo). Os tratamentos com os extratos

aquoso, etanólico e hexânico de *P.torta* (40µg/mL), nas condições descritas para esse estudo, não mostraram ação agonista sobre o ERβ ($P > 0,05$ vs veículo).

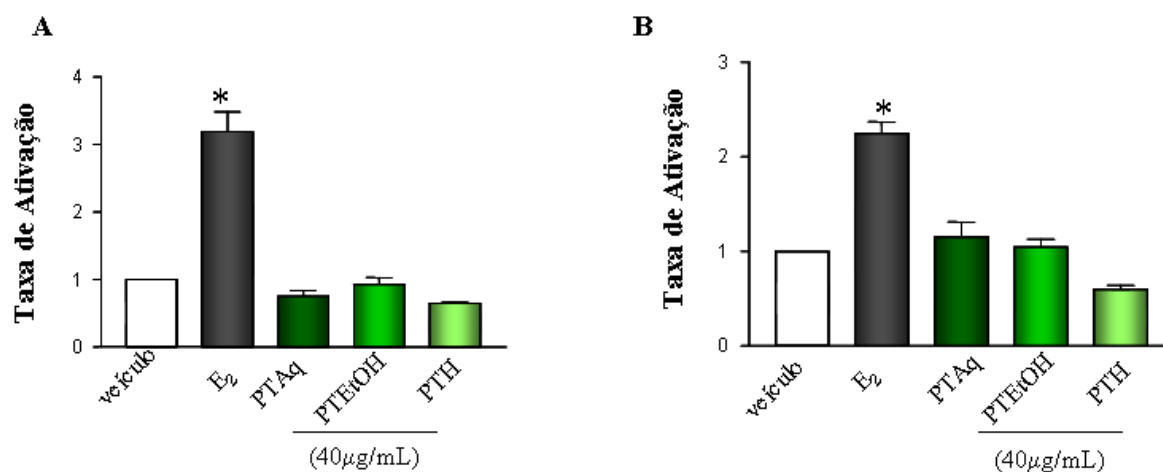


Figura 19. Ausência de ação agonista dos extratos de *Pouteria torta* sobre a atividade transcricional mediada por ERα e ERβ. Células U937 foram co-transfectadas com 2µg do plasmídeo de expressão para ERα ou ERβ e com 3µg do plasmídeo repórter luciferase ERE-Luc. As células foram tratadas por 24 horas com o veículo (DMSO:EtOH), com o controle positivo (estradiol 10⁻⁷ mol/L) e com os extratos PTAq, PTEtOH e PTH (40µg/mL). Posteriormente, as células foram lisadas e reagidas com luciferina. As barras representam a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos. **A)** Células U937 tratadas com os extratos de *P.torta* não aumentaram a atividade transcricional mediada pelo ERα. (* $P < 0,05$ vs veículo) **B)** Células tratadas com os extratos de *P.torta* não aumentaram a atividade transcricional mediada pelo ERβ. (* $P < 0,05$ vs veículo)

4.2.3. Estudo do efeito antagonista de extratos de *Pouteria torta* sobre a atividade transcricional mediada pelos ERα e ERβ

Como os extratos PTAq, PTEtOH e PTH não apresentaram ação agonista para ERα ou ERβ, foi decidido investigar a ação dos extratos na presença do estradiol e com isso verificar uma possível ação antagonista.

As células tratadas com E₂ (controle positivo) tiveram um aumento de 3,26 ± 0,23 vezes ($P < 0,05$ vs veículo) na atividade transcricional do ERα e os extratos PTAq, PTEtOH e PTH, na presença do estradiol, induziram um aumento na atividade transcricional em, respectivamente, 3,17 ± 0,29, 3,1 ± 0,67 e 3,91 ± 0,57 vezes ($P < 0,05$ vs veículo). Estes resultados, apresentados na **Figura 20A**, sugerem que os extratos de *P. torta*

não modificam a atividade transcricional induzida pelo estradiol. Portanto, os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *P. torta*, nas condições experimentais, não tiveram efeito antagonista sobre o ER α .

Resultados similares foram obtidos quando investigada a ação dos extratos aquoso e etanólico sobre a atividade transcricional mediada por ER β (**Figura 20B**). O estradiol aumentou a atividade transcricional do ER β em $2,25 \pm 0,12$ vezes ($P < 0,001$ vs veículo). As células tratadas com estradiol na presença dos extratos aquoso ou etanólico de *P. torta* aumentaram a atividade transcricional do ER β em, respectivamente, $1,89 \pm 0,1$ e $1,97 \pm 0,14$ ($P < 0,05$ vs veículo). Não houve diferença estatística comparado com o tratamento com estradiol somente.

Entretanto, as células tratadas com estradiol e extrato hexânico tiveram uma redução de 38% na atividade transcricional do ER β (taxa de ativação $1,39 \pm 0,01$ contra $2,25 \pm 0,12$ obtida somente com estradiol).

Nas condições analisadas nesse estudo os resultados obtidos com a espécie *P. torta* sugerem que os extratos aquoso e etanólico não apresentam a capacidade de antagonizar o efeito do estradiol, no entanto, o extrato hexânico contém substâncias com a capacidade de interferir na atividade transcricional induzida pelo estradiol, sugerindo uma ação antagonista desse extrato sobre o ER β .

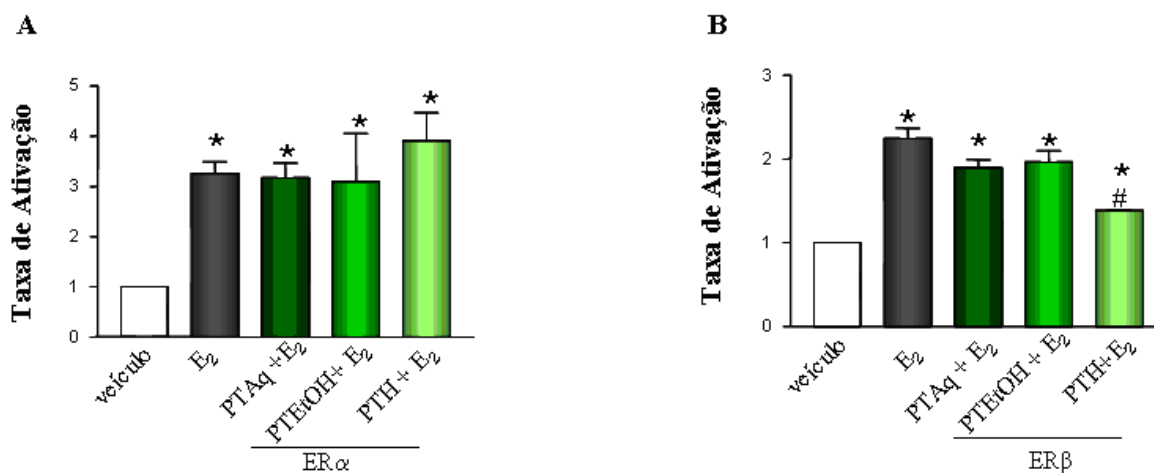


Figura 20. Efeito antagonista do extrato hexânico de *Pouteria torta* sobre a atividade transcricional mediada por ERβ e ausência desse efeito para ERα. Células U937 foram co-transfectadas com 3μg do plasmídeo repórter luciferase que contém o elemento responsivo do ER (ERE-Luc) e com 2μg do plasmídeo de expressão para ERα ou ERβ. Células foram tratadas com E₂ 10⁻⁷mol/L (controle positivo) e os extratos de *P. torta* (PTAq, PTEtOH e PTH - 40μg/mL) na presença de estradiol (10⁻⁷ mol/L). Após 24 horas dos tratamentos as células foram lisadas e adicionada a luciferina. As barras representam a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos. **A)** A atividade transcricional do ERα, induzida pelo estradiol, não foi antagonizada pela adição dos extratos PTAq, PTEtOH e PTH ($P > 0,05$ vs estradiol). **B)** A atividade transcricional do ERβ, induzida pelo estradiol, foi reduzida em 38% na presença do extrato hexânico (PTH) ($^{\#}P < 0,05$ vs estradiol). Os extratos PTAq e PTEtOH não tiveram efeito antagonista na atividade transcricional do ERβ induzida pelo estradiol ($P > 0,05$ vs estradiol).

4.2.4. Estudo do efeito antagonista do extrato hexânico de *Pouteria torta* sobre a atividade transcricional mediada pelo ERβ

Como exposto quando da descrição das metodologias utilizadas, para avaliar a diminuição transcricional induzida pelo extrato PTH, foram realizados novos ensaios de transfecção sendo utilizados dois plasmídeos: **a)** um quimérico que contém o domínio de ligação ao DNA da β-galactosidase associada ao domínio de ligação ao hormônio do ERβ (Gal-ERβ) e **b)** o plasmídeo repórter Gal-Luc que contém o elemento responsivo do fator de transcrição da β-galactosidase (Gal), conduzindo a expressão da enzima luciferase. A mudança de plasmídeo foi para intensificar o sinal de leitura.

Considerando a ativação induzida pelo estradiol (controle positivo) como 100%, o extrato PTH na concentração de 10 μg/mL não interferiu na atividade transcricional do ERβ induzida pelo estradiol, uma vez que apresentou um valor de 91% ± 3,8, em relação ao

obtido pelo estradiol isoladamente ($P > 0,05$ vs E_2). Por outro lado, quando adicionado em concentrações crescentes de 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, o PTH antagonizou o efeito transcricional induzido pelo estradiol no $\text{ER}\beta$ que atingiu valores de $54\% \pm 2,7$, $51\% \pm 3,8$ e $39\% \pm 3,7$, respectivamente ($P < 0,001$ vs E_2). Portanto, PTH apresenta um efeito antagonista sobre o $\text{ER}\beta$ que é dose dependente (**Figura 21**).

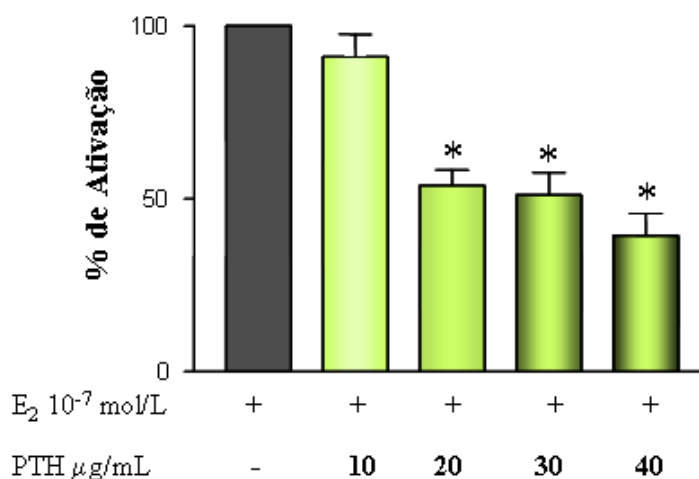


Figura 21. Efeito antagonista observado com doses crescentes do extrato hexânico de *Pouteria torta* sobre a atividade transcricional mediada pelo $\text{ER}\beta$. Células U937 foram co-transfectadas com 3 μg do plasmídeo quimérico Gal- $\text{ER}\beta$ e com 2 μg do plasmídeo repórter Gal-Luc. As células foram tratadas por 24 horas com estradiol (10^{-7} mol/L) e com doses crescentes de *Pouteria torta* misturada com E_2 . A atividade da luciferase foi então mensurada. O extrato PTH, nas concentrações 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, antagonizou o efeito do estradiol sobre o $\text{ER}\beta$ (* $P < 0,001$ vs estradiol), o mesmo não foi observado com a concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ de PTH ($P > 0,05$ vs estradiol). As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos diferentes.

Em seguida, para determinar o tipo de antagonismo induzido pelo extrato PTH sobre o $\text{ER}\beta$, foi feita uma curva dose-resposta do estradiol (concentrações de 10^{-12} a 10^{-6} mol/L) na presença de uma concentração fixa de 40 $\mu\text{g/mL}$ do extrato hexânico de *P. torta* (**Figura 22**). Esta foi a concentração escolhida porque atingiu a inibição máxima sobre $\text{ER}\beta$. Como pode ser observado, na presença de PTH o estrogênio, mesmo em alta concentração (10^{-7} mol/L), não conseguiu induzir uma resposta máxima comparável à observada com estrogênio isoladamente mesmo na concentração de 10^{-11} mol/L. A soma deste resultado com o observado na figura 21, que avaliou o efeito de estrogênio na concentração de 10^{-7} mol/L, sugere que o extrato hexânico de *Pouteria torta* possui atividade antagonista não competitiva sobre o $\text{ER}\beta$.

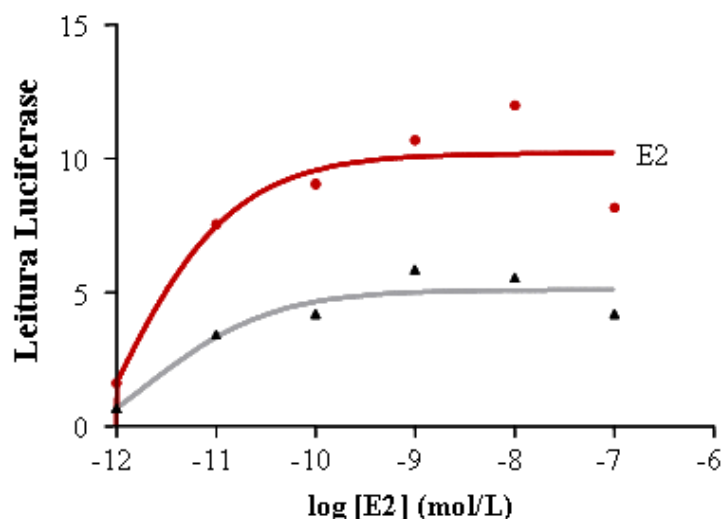


Figura 22. Curva dose-resposta do estradiol na presença de PTH. Células U937 foram co-transfectadas com 3 μ g do plasmídeo quimérico Gal-ER β e com 2 μ g do plasmídeo repórter Gal-Luc. As células foram tratadas por 24 horas com doses crescentes de estradiol (10^{-12} a 10^{-6} mol/L) na presença ou ausência de PTH na concentração fixa de 40 μ g/mL. A atividade da luciferase foi então mensurada. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de três experimentos. O efeito observado foi o deslocamento da curva do estradiol na presença de PTH para baixo, sendo que a resposta máxima observada somente com o estradiol não foi atingida quando o estradiol estava na presença de PHT.

Os resultados obtidos nas condições experimentais sugerem que os extratos aquoso e etanólico de *P. torta* não têm ação (agonista ou antagonista) sobre a atividade transcricional mediada por ER α ou ER β , no entanto, o extrato hexânico apresenta um antagonismo não competitivo para o ER β . Essa ação inibitória induzida pelo extrato hexânico não foi observada para o ER α .

Estrogênios agem como um potente agente mitogênico em um grande número de cânceres de mama, e o uso de antagonista de ER é considerado uma terapia endócrina de grande magnitude para o tratamento da doença. ER α e ER β são expressos em glândulas mamárias de ratos, sugerindo que ambos os receptores podem ser considerados alvos da ação antiestrogênica na mama (Tremblay, Tremblay et al. 1998).

Assim, o isolamento das substâncias responsáveis por essa ação abre um campo para a busca de novos ligantes para o ER β e para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de câncer de mama.

4.3. *PLECTRANTHUS ORNATUS*

A família Lamiaceae compreende várias espécies citadas como potenciais fontes de compostos antifúngicos, antibacterianos e inseticidas (Rasikari, Leach et al. 2005). Poucos estudos, porém descrevem o fracionamento monitorado por atividades biológicas para o isolamento de compostos associados a usos etnobotânicos das espécies de *Plectranthus*, que pertencem à família Lamiaceae (Lukhoba, Simmonds et al. 2006).

Extratos brutos de *P. barbatus* mostraram atividade antiinflamatória no ensaio de inibição da ciclooxigenase (COX- 1) (Matu and van Staden 2003).

Alquilcatecóis obtidos de *P. sylvestris* mostraram efeito inibitório dose-dependente sobre a lipooxigenase em ensaio espectrofotométrico direto (Juch and Ruedi 1997).

Apesar dos poucos testes biológicos realizados com as espécies de *Plectranthus*, elas são extensivamente usadas na medicina popular como alternativa terapêutica para o tratamento de doenças do fígado e de inflamações peitorais. São também usadas com finalidade de ação diurética, analgésica, antibiótica, adstringente e antipirética (Corrêa, Batista et al. 1998).

Estudos mais recentes mostraram que o extrato etanólico bruto e o diterpeno ácido 11*R**-acetoxicolavênico (**23**) isolado do extrato hexânico, ambos das folhas de boldinho, apresentaram ação antinociceptiva (Oliveira, Ferreira et al. 2005).

Partindo desses dados preliminares foi investigado se extratos e substâncias químicas isoladas de *P. ornatus* poderiam agir em receptores nucleares, com ênfase para a investigação de uma possível ação antiinflamatória mediada pelo receptor de glicocorticóide (GR).

4.3.1. Estudo do efeito tóxico de extratos de *Plectranthus ornatus* para as células U937.

Testes de toxicidade utilizando o plasmídeo CMV-Luc foram realizados com os extratos hexânico (POH) e etanólico (POEtOH) das folhas de *P. ornatus* (fornecidos pela doutoranda Patrícia M. Oliveira do Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil).

Como mostrado na **Figura 23**, os extratos POH e POEtOH (40µg/mL) não apresentaram toxicidade para as células U937. Entretanto, foi observado um aumento na expressão gênica do CMV-luciferase quando as células foram tratadas com POH. Esse

mesmo estímulo também foi observado quando as células foram tratadas com dexametasona (Dex) - uma substância agonista para esse receptor. Provavelmente, a ocorrência do aumento na transcrição da luciferase deva-se a ligação da dexametasona e alguma substância presente no extrato hexânico de *P. ornatus* no promotor do CMV. O gene que codifica a luciferase está ligado ao promotor do CMV, substâncias que tenham a capacidade de se ligarem neste promotor irão ativar a expressão da luciferase.

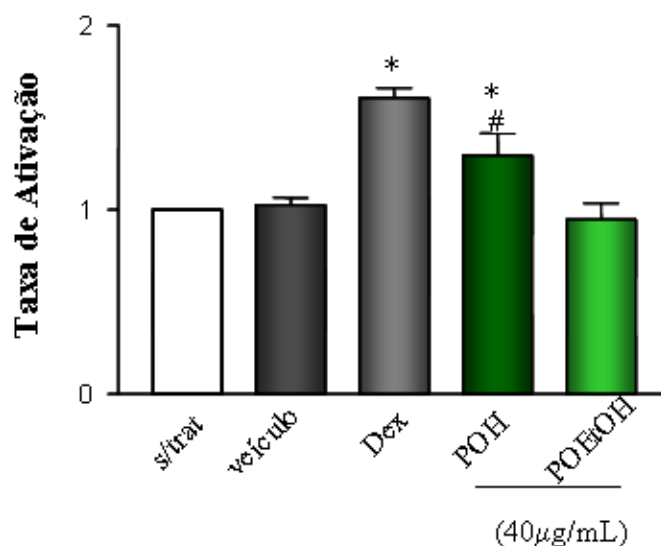


Figura 23. Ausência de efeito tóxico dos extratos de *Plectranthus ornatus* para as células U937. Células U937 foram transfectadas com 3µg do plasmídeo repórter luciferase conduzido pelo promotor constitutivo do citomegalovírus (CMV-Luc) e tratadas com dexametasona (10^{-6} mol/L) e com extratos POH e POEtOH (40µg/mL). Um grupo de células foi mantido sem tratamento (controle positivo). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. Os extratos POH e POEtOH não apresentaram toxicidade para as células U937. Dex e POH estimularam a expressão gênica do CMV-Luc. As barras representam a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos. (* $P < 0,05$ vs s/tratamento e # $P < 0,05$ vs dexametasona)

4.3.2. Estudo do efeito agonista de extratos de *P. ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelo GR

Determinada a atoxicidade dos extratos para a maquinaria transcricional das células U937, foi investigado se os extratos POH e POEtOH apresentavam efeito agonista para o GR.

Células U937 foram tratadas com os extratos (hexânico e etanólico de *P. ornatus* - 40µg/mL) e com dexametasona (10^{-6} mol/L) (controle positivo). Como se pode observar na

Figura 24, o tratamento com Dex e POH aumentou a atividade transcricional ($P > 0,05$ vs Dex) no GR (taxa de ativação com Dex e POH: $2,63 \pm 0,13$ e $2,01 \pm 0,28$, respectivamente). O extrato etanólico de *P. ornatus* não teve efeito na atividade transcricional do GR (taxa de ativação $1,30 \pm 0,1$).

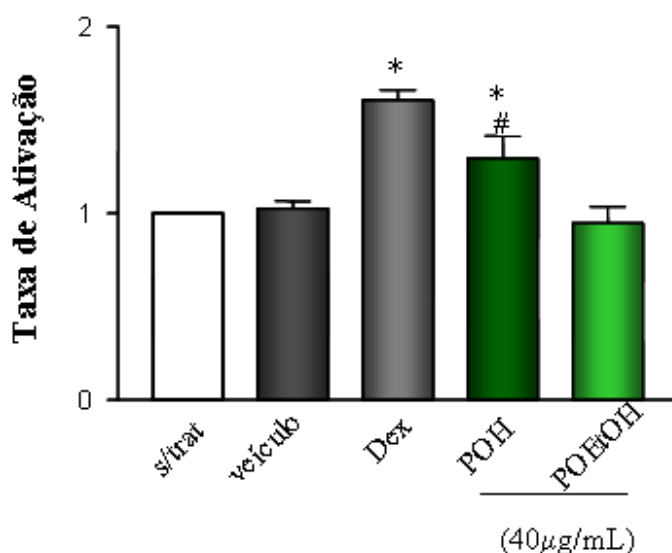


Figura 24. Efeito agonista do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelo GR. Células U937 foram co-transfectadas com $2\mu\text{g}$ do plasmídeo de expressão do GR e com $3\mu\text{g}$ do plasmídeo que contém o elemento responsivo do GR ligado ao gene repórter (GRE-Luc). As células foram tratadas por 24 horas com dexametasona 10^{-6} mol/L (controle positivo) e com os extratos POH e POEtOH ($40\mu\text{g/mL}$). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo quatro experimentos. (* $P < 0,05$ vs veículo e # $P > 0,05$ vs dexametasona)

O aumento na atividade transcricional do GR induzido na presença de $40\mu\text{g/L}$ de extrato hexânico *Plectranthus ornatus* sugere a presença de uma ou mais substâncias biologicamente ativas e com ação agonista para o receptor de glicocorticóide.

4.3.3. Estudo do efeito antagonista de extratos de *P. ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelo GR

A partir dos resultados encontrados – ação agonista do extrato hexânico – foi pesquisada a ação dos extratos de *P. ornatus* na presença de dexametasona.

Foram realizados os seguintes tratamentos: somente dexametasona e dexametasona na presença de POH ou de POEtOH, todos foram efetivos em aumentar a atividade

transcricional do GR ($2,63 \pm 0,13$, $3,91 \pm 0,39$ e $2,97 \pm 0,24$ vezes, respectivamente). (figura 25). Entretanto, o valor de ativação encontrado no grupo de células que recebeu o tratamento de dexametasona na presença de POH foi significativamente maior ($P < 0,01$ vs Dex) do que o valor encontrado com o grupo de células tratadas com dexametasona isoladamente.

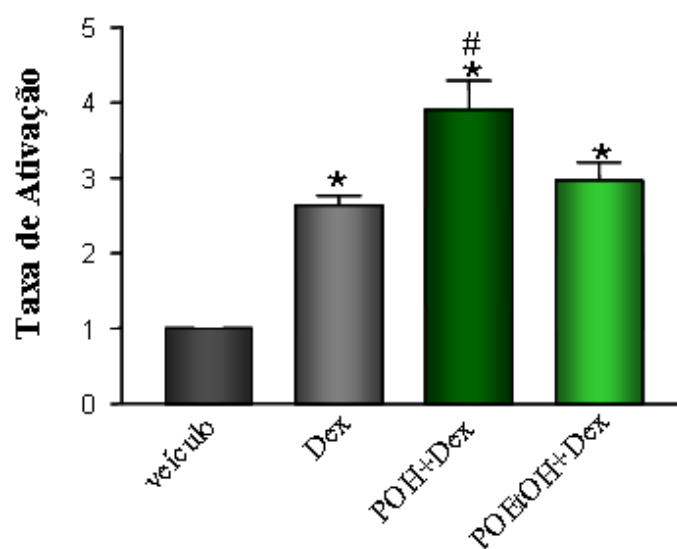


Figura 25. Ausência de efeito antagonista de extratos de *Plectranthus ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelo GR. Células U937 foram co-transfectadas com 2µg do plasmídeo de expressão do GR e com 3µg do plasmídeo que contem o elemento responsivo do GR ligado ao gene repórter (GRE-Luc). As células foram tratadas por 24 horas com dexametasona 10^{-6} mol/L (controle positivo) e com os extratos POH e POEtOH (40µg/mL) na presença de dexametasona (10^{-6} mol/L). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média ± erro padrão de no mínimo quatro experimentos. (* $P < 0,05$ vs veículo e # $P < 0,05$ vs dexametasona)

Esse resultado - aumento na atividade transcricional do GR induzida pela Dex na presença do extrato hexânico de *P. ornatus* - chama a atenção, pois a concentração de dexametasona utilizada nos ensaios (10^{-6} mol/L) já promove a máxima ativação induzida por esse ligante no GR, como mostrado no ensaio de curva dose-resposta com dexametasona. (Figura 26)

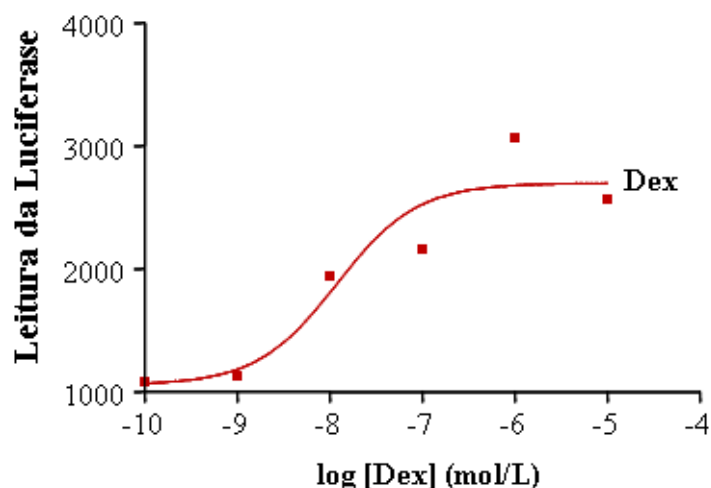


Figura 26. Curva dose-resposta de dexametasona no GR. Células U937 foram co-transfectadas com 3 μ g do plasmídeo repórter GRE-Luc e com 2 μ g do plasmídeo de expressão para GR. As células foram tratadas por 24 horas com concentração crescentes de dexametasona. A atividade da luciferase foi, então, mensurada. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos diferentes.

O aumento na atividade transcricional do GR observado com o tratamento de Dex na presença de POH pode sugerir que haja uma ligação inespecífica do POH no promotor do GRE-Luc (promotor mínimo da timidina quinase), ou ainda, que possa haver alguma substância presente no extrato com ação na conformação do receptor proporcionando uma maior exposição do sítio de ligação para a substância agonista ou proporcionando uma maior ligação com os co-ativadores.

4.3.4. Estudo do efeito agonista do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β

Foi avaliado também se o extrato POH (40 μ g/mL) poderia ter alguma ação sobre a atividade transcricional mediada pelos receptores de estrogênio (ER α e ER β). Como mostrado na **Figura 27**, quando comparado com o veículo, a ativação transcricional em presença de E₂ e POH foi de 4,26 \pm 0,22 e 1,15 \pm 0,36 vezes, respectivamente, para o ER α e 4,36 \pm 0,14 e 0,67 \pm 0,08 vezes, respectivamente, para o ER β . Os resultados indicam, portanto, que nas condições analisadas nesse estudo o extrato hexânico de *P. ornatus* não possui substância com ação agonista sobre os receptores de estrogênio alfa e beta.

Como comentado anteriormente, os elementos responsivos dos receptores de estrogênios e de glicocorticóide estão inseridos no promotor mínimo da timidina quinase. Portanto, o aumento da atividade transcricional observado com o tratamento de dexametasona na presença de POH em relação ao tratamento apenas com dexametasona para o GR, não pode ser explicado pela presença de alguma substância no POH que se ligue ao promotor do elemento responsivo do GR, se isso fosse verdade deveria ser observado o mesmo efeito nos receptores de estrogênios.

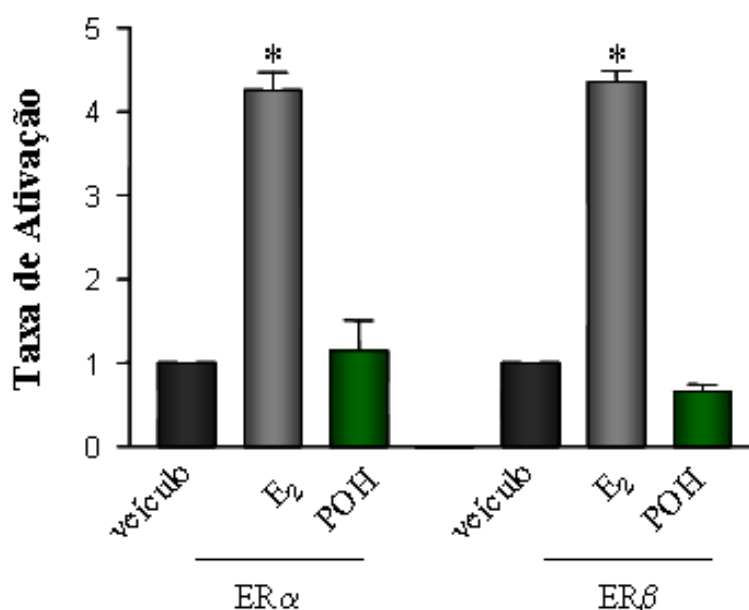


Figura 27. Ausência de efeito agonista do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α e ER β . Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g dos plasmídeos de expressão para ER α ou ER β e com 3 μ g do plasmídeo repórter ERE-Luc. As células foram tratadas com o veículo, com estradiol 10⁻⁷mol/L (controle positivo) e com POH (40 μ g/mL). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam à média \pm erro padrão de no mínimo quatro experimentos. (* $P < 0,01$ vs veículo)

4.3.5. Estudo do efeito antagonista do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β

Como o extrato hexânico de folhas de boldinho não apresentou efeito agonista para os receptores de estrogênio alfa e beta, investigou-se se esse extrato poderia ter algum efeito antagonista para esses receptores.

A taxa de ativação transcricional do ER α na presença de E2 foi de 4,26 \pm 0,22. A adição do extrato hexânico de *P. ornatus* - POH - (em presença do E2) não diminuiu a taxa

de ativação ($4,36 \pm 0,11$). Em ER β as taxas de ativação com E2 somente e E2 na presença de POH foram $4,36 \pm 0,14$ e $4,36 \pm 0,11$, respectivamente.

Os valores encontrados na atividade transcricional nos grupos de células tratadas somente com E₂ e com E₂ na presença de POH, não apresentaram diferença estatística, tanto para ER α como para ER β ($P > 0,05$ vs estradiol). Os resultados estão apresentados na **Figura 28**.

Esses resultados indicam que a mistura do extrato hexânico de *P. ornatus* com estradiol não modifica a atividade transcricional exibida pelo estradiol. Portanto, nas condições experimentais, não houve efeito antagonista de POH sobre os receptores de estrogênio (isoformas alfa e beta).

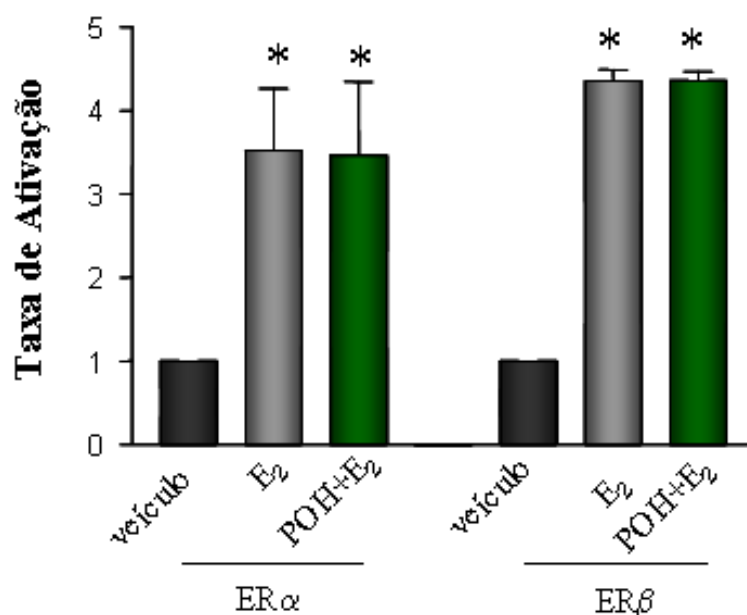


Figura 28. Ausência do efeito antagonista do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α e ER β . Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g dos plasmídeos de expressão para ER α ou ER β e com 3 μ g do plasmídeo repórter ERE-Luc. As células foram tratadas com o veículo, com estradiol 10^{-7} mol/L (controle positivo) e com estradiol na presença de POH (40 μ g/mL). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam à média \pm erro padrão de no mínimo quatro experimentos. (* $P < 0,01$ vs veículo).

4.3.6. Estudo do efeito tóxico dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de folhas de *Plectranthus ornatus* para as células U937

Uma vez que o extrato hexânico de *P. ornatus* (POH) teve uma ação agonista no receptor de glicocorticóide, foi investigado se os constituintes químicos isolados desse extrato (23, 26 e 27) poderiam ser os responsáveis por esse efeito.

Inicialmente foi testado o potencial tóxico dos diterpenos 23, 26 e 27, isolados de POH, para a maquinaria transcricional das células. Células U937 foram transfectadas com o plasmídeo CMV-Luc e tratadas com o veículo usado para a diluição dos diterpenos (DMSO:EtOH) e com os diterpenos 23, 26 e 27 (10^{-6} mol/L). Para o controle positivo um grupo de células foi mantido sem tratamento. Não houve diferença estatística nos valores de ativação encontrados para o veículo e para os diterpenos de *P. ornatus* (23, 26 e 27) quando comparados os valores encontrados para o grupo de células que não sofreram tratamento ($P > 0,05$ vs s/tratamento). Assim, o veículo e os diterpenos são atóxicos para as células U937 (Figura 29).

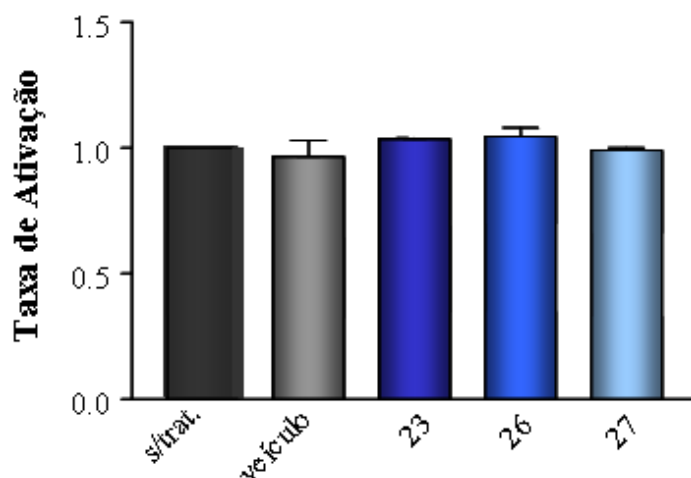


Figura 29. Ausência de efeito tóxico dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* para as células U937. Células U937 foram transfectadas com $3\mu\text{g}$ do plasmídeo repórter luciferase conduzido pelo promotor constitutivo do citomegalovírus (CMV-Luc) e tratadas com o veículo (DMSO/EtOH 2:3) e com os diterpenos 23, 26 e 27 (10^{-6} mol/L). Um grupo de células foi mantido sem tratamento (controle positivo). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. ($P > 0,05$ vs sem tratamento)

4.3.7. Estudo do efeito agonista dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelo GR

Determinada a atoxicidade dos diterpenos isolados do extrato POH para as células U937 foi investigada, então, a ação deles sobre a atividade transcricional mediada pelo GR. Como mostrado na **Figura 30**, quando comparado com o veículo, a dexametasona (10^{-6} mol/L) promoveu um aumento na atividade transcricional de $2,64 \pm 0,18$ vezes ($P < 0,001$ vs veículo). Os diterpenos **23**, **26** e **27** não tiveram efeito na atividade transcricional do GR, uma vez que a taxa de ativação foi igual ao do controle (grupo de células tratadas somente com o veículo) ($P > 0,05$ vs veículo). Assim sendo, testados isoladamente e com a concentração fixa de 10^{-6} mol/L, os compostos **23**, **26** e **27**, isolados do extrato hexânico de *P. ornatus*, não apresentaram ação agonista sobre o GR.

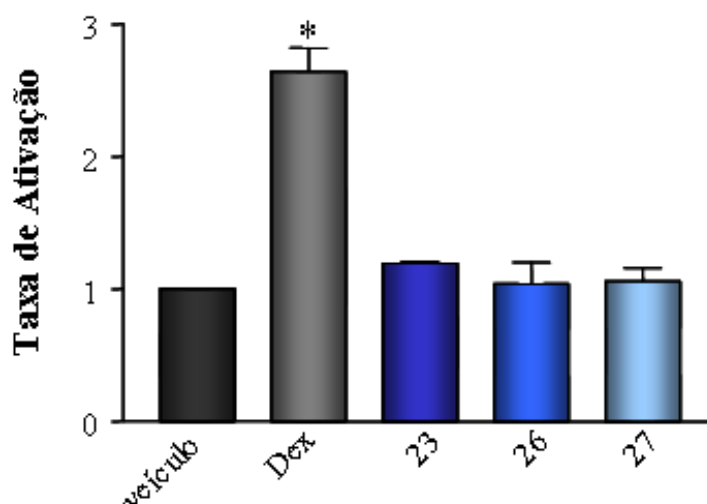


Figura 30. Ausência de efeito agonista dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* para o GR. Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do plasmídeo de expressão do GR e com 3 μ g do plasmídeo que contém o elemento responsivo do GR ligado ao gene repórter (GRE-Luc). As células foram tratadas por 24 horas com o veículo, com a dexametasona 10^{-6} mol/L (controle positivo) e com os constituintes químicos isolados de extrato hexânico de *P. ornatus*, **23**, **26** e **27** (10^{-6} mol/L). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo quatro experimentos. (* $P < 0,001$ vs veículo)

4.3.8. Estudo do efeito antagonista dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* sobre a atividade transcricional mediada pelo GR

Como mostrado na **Figura 31**, os diterpenos **23**, **26** e **27**, na presença de dexametasona (Dex) não foram capazes de antagonizar o efeito produzido somente pela Dex (taxa de ativação dos diterpenos **23**, **26** e **27** - $3,35 \pm 0,36$, $3,18 \pm 0,55$ e $3,22 \pm 0,66$, respectivamente) ($P > 0,05$ vs Dex). A taxa de ativação da Dex foi de $2,64 \pm 0,18$ ($P < 0,05$ vs veículo).

Estes resultados indicam que os constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* na presença de dexametasona não modificam a atividade transcricional exibida somente pela dexametasona e, portanto, testados isoladamente e na concentração de 10^{-6} mol/L, eles não apresentam efeito antagonista sobre o receptor de glicocorticóide.

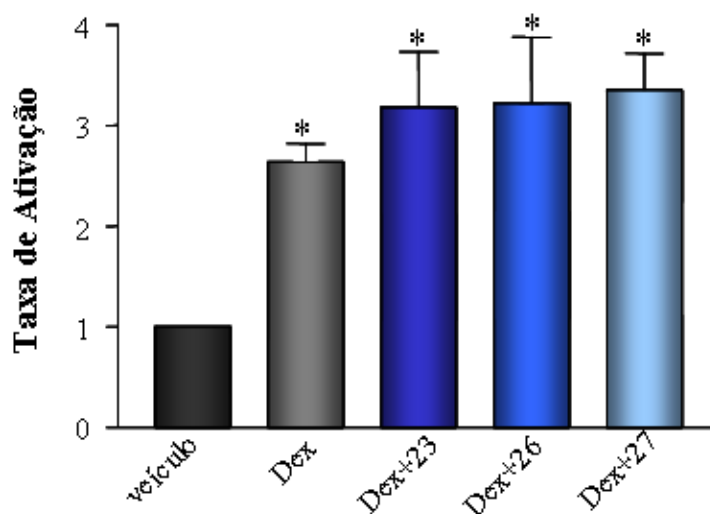


Figura 31. Ausência de efeito antagonista dos constituintes químicos isolados do extrato hexânico de *Plectranthus ornatus* para o GR. Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do plasmídeo de expressão para GR e com 3 μ g do plasmídeo que contém o elemento responsivo para o GR ligado ao gene repórter da luciferase - GRE-Luc. As células foram tratadas com o veículo (DMSO:EtOH), com o controle positivo (dexametasona - 10^{-6} mol/L) e com os diterpenos **23**, **26** e **27** (10^{-6} mol/L) na presença de dexametasona (10^{-6} mol/L). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. (* $P < 0,05$ vs veículo)

Assim, nas condições experimentais, o aumento da atividade transcricional do GR, observado no grupo de células tratadas com o extrato hexânico (POH) e com dexametasona na presença de POH, não foi induzido pelos diterpenos (**23**, **26** e **27**) isolados desse extrato.

Muitas vezes a ação biológica observada com extratos de plantas deve-se a uma ação sinérgica de vários constituintes químicos presente no extrato. Futuros experimentos deverão ser realizados com o extrato hexânico e com os diterpenos juntos para tentar identificar o responsável, ou responsáveis, pelo aumento na atividade transcricional do GR e também por qual mecanismo esse aumento da atividade transcricional do GR está ocorrendo.

Um fato importante é que os experimentos sugerem a presença de uma ou mais substâncias com ação agonista para o receptor do glicocorticóide, confirmando o uso popular de *Plectranthus ornatus* como antiinflamatório. Os resultados apresentados nesse estudo abrem um vasto campo de pesquisa na identificação de novas substâncias com potencial antiinflamatório nessa espécie.

4.4 IPOMOEA CAIRICA (L.) SWEET

Apesar de a espécie *I. cairica*, integrante da família Convolvulaceae, ser comum em várias partes do mundo, há poucos estudos sobre sua ação biológica.

Foi então investigado se o extrato etanólico das partes aéreas de *I. cairica* e substâncias isoladas a partir desse extrato poderiam apresentar uma ação sobre os receptores de estrogênio, visto que essa família possui esteróides como um fitoconstituente (Lima and Braz-Filho 1997).

O potencial estrogênico e tóxico do extrato e substâncias isoladas de *I. cairica* foi testado utilizando-se a metodologia de transfecção e ensaio de gene repórter em células U937.

4.4.1. Estudo do efeito tóxico de *Ipomoea cairica* para as células U937

O controle da atividade tóxica do extrato etanólico de *I. cairica* (ICEtOH) para a maquinaria transcricional das células U937 foi realizado utilizando o plasmídeo CMV-Luc.

Como pode ser observado na **Figura 32**, a adição de 40µg/mL do extrato etanólico de *I. cairica* não apresentou efeito tóxico para as células U937.

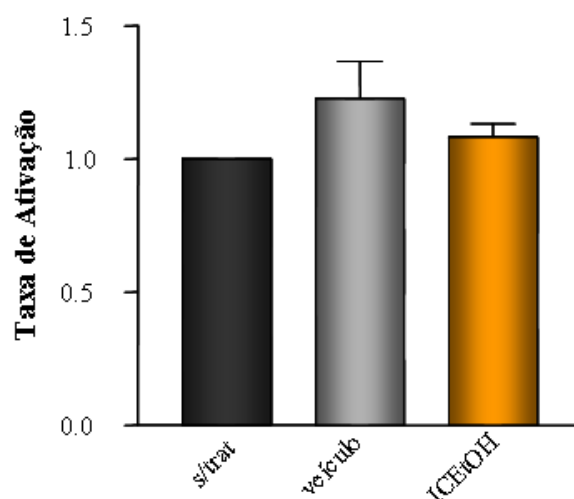


Figura 32. Ausência de efeito tóxico do extrato de *Ipomoea cairica* para as células U937. Células U937 foram transfectadas com 3 μ g do plasmídeo repórter luciferase conduzido pelo promotor constitutivo do citomegalovírus (CMV-Luc) e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH) e com o extrato ICEtOH, (40 μ g/mL). Um grupo foi mantido sem nenhum tratamento (controle positivo). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. ($P > 0,05$ vs s/tratamento)

4.4.2. Efeito agonista de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β

Partindo da informação da existência de esteróides na família Convolvulaceae foi investigado se o extrato etanólico dessa espécie (ICEtOH) poderia ter uma ação sobre ER α e ER β .

Como pode ser observado na **Figura 33**, células tratadas com E₂ (controle positivo) tiveram um aumento na atividade transcricional em $2,74 \pm 0,14$ vezes ($P < 0,001$ vs veículo) para o ER α e $2,74 \pm 0,26$ vezes ($P < 0,05$ vs veículo) para o ER β . Não foi observada alteração na atividade transcricional de ER α ou ER β quando as células foram tratadas com a concentração de 40 μ g/mL de ICEtOH ($P > 0,05$ vs veículo). Estes resultados indicam que o extrato etanólico de *I. cairica*, nas condições experimentais, não mostrou efeito agonista sobre o ER α e ER β .

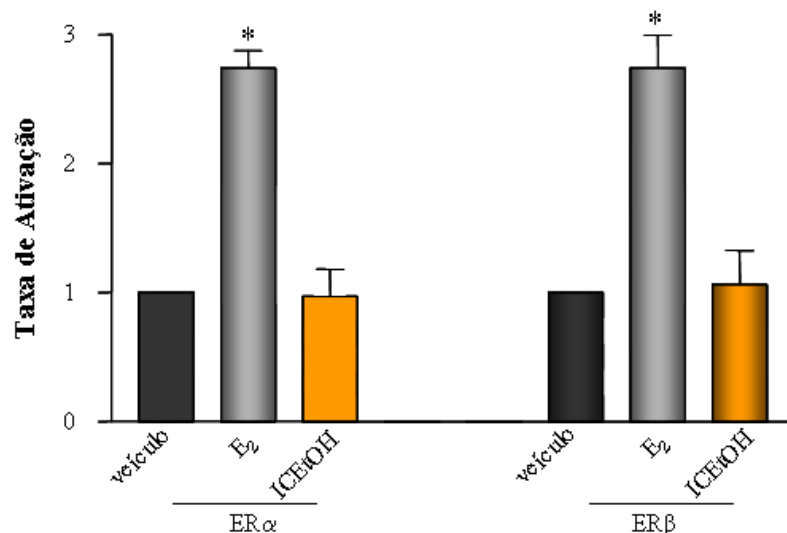


Figura 33. Ausência de efeito agonista do extrato de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada pelos receptores de estrogênio ER α e ER β . Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do plasmídeo de expressão para ER α ou ER β e com 3 μ g do plasmídeo que contém o elemento responsivo para o ER ligado ao gene repórter da luciferase - ERE-Luc. As células foram tratadas com o veículo (DMSO:EtOH), com o controle positivo (estradiol 10⁻⁷ mol/L) e com o extrato etanólico de folhas de *I. cairica* (40 μ g/mL). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. (* $P < 0,05$ vs veículo)

4.4.3. Estudo do efeito antagonista de extratos de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada pelos ER α e ER β

Uma vez que o extrato etanólico de *I. cairica* não apresentou ação agonista para ER α ou ER β , foi investigada a ação desse extrato na presença do estradiol para ser verificada uma possível ação antagonista.

O E₂ (controle positivo) aumentou a atividade transcricional do ER α em $2,8 \pm 0,42$ vezes ($P < 0,001$ vs veículo) e $2,74 \pm 0,27$ vezes ($P < 0,01$ vs veículo) para o ER β . O aumento na atividade transcricional induzida pelo ICEtOH na presença de E₂ foi de $1,92 \pm 0,33$ vezes ($P < 0,01$ vs veículo e $P < 0,01$ vs E₂) para o ER α e de $3,38 \pm 0,83$ vezes ($P < 0,05$ vs veículo) para o ER β (figura 34).

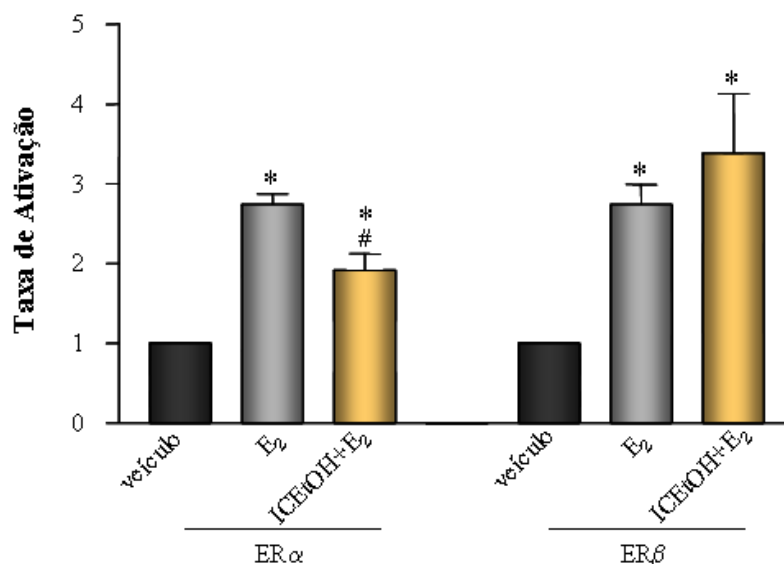


Figura 34. Atividade antagonista do extrato de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada por ER α e ausência desse efeito sobre o ER β . Células U937 foram co-transfectadas com 3 μ g do plasmídeo que contem o elemento responsivo do ER ligado ao gene repórter luciferase (ERE-Luc) e com 2 μ g do plasmídeo de expressão para ER α ou ER β . Células foram tratadas com E₂ 10⁻⁷mol/L (controle positivo) e com o extrato etanólico de *I. cairica* (ICEtOH - 40 μ g/mL) na presença de estradiol (10⁻⁷ mol/L). Após 24 horas as células foram lisadas e reagidas com luciferina. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos diferentes. (* $P < 0,05$ vs veículo e # $P < 0,01$ vs E₂)

O efeito obtido, no grupo de células tratadas com E₂ na presença do ICEtOH, foi uma diminuição na atividade transcricional mediada pelo ER α quando comparadas ao grupo tratado somente com E₂. Há, portanto a indicação de um efeito antagonista desse extrato sobre o ER α . O mesmo extrato na presença de E₂ não mostrou efeito antagonista para o ER β .

Foi testada a ação das substâncias obtidas a partir do extrato etanólico de *I. cairica*: traquelogenina (29), arctigenina (28), ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (30) e ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (31) sobre os receptores de estrogênio (isoformas α e β) para investigar se foram elas as responsáveis pelo efeito antagonista observado com o extrato etanólico de *I. cairica* sobre o ER α .

4.4.4. Estudo do efeito tóxico das substâncias 29, 28, 31 e 30 de *Ipomoea cairica* para as células U937

Inicialmente foi testada a toxicidade das substâncias isoladas do extrato etanólico de *Ipomoea cairica* (29, 28, 31 e 30) na concentração de 40µg/mL para as células U937. Para tanto, foi realizada uma transfecção com o plasmídeo CMV-Luc.

A **Figura 35** mostra a ativação induzida no grupo de células tratadas com as substâncias que foi igual à ativação obtida no grupo não submetido a nenhum tratamento ($P > 0,05$ vs s/tratamento). Assim, as substâncias na concentração testada foram atóxicas para as células U937.

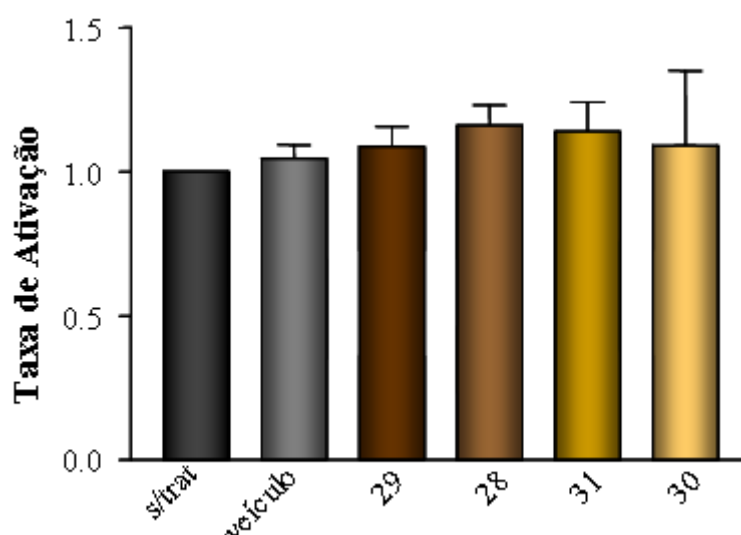


Figura 35. Ausência de efeito tóxico das substâncias 29, 28, 31 e 30 isoladas de *Ipomoea cairica* para as células U937. Células U937 foram transfectadas com 3µg do plasmídeo que contém o gene de expressão para a luciferase conduzido pelo promotor constitutivo do citomegalovírus (CMV-Luc) e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH) e com as substâncias 29, 28, 31 e 30 (40µg/mL). Um grupo foi mantido sem nenhum tratamento (controle positivo). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos. ($P > 0,05$ vs s/tratamento)

4.4.5. Estudo do efeito agonista das substâncias 29, 28, 31 e 30 isoladas de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α

Determinada a atoxicidade das substâncias isoladas do extrato etanólico para as células U937, foi investigado se as mesmas poderiam ter ação sobre os receptores de estrogênio e serem as responsáveis pelo efeito antagonista sobre o ER α .

Células U937 foram tratadas com as substâncias 29, 28, 31 e 30 (40 μ g/mL) e estradiol (10⁻⁷mol/L). Como pode ser observado na **Figura 36**, as células tratadas com estradiol apresentaram um aumento na atividade do ER α em 2,75 \pm 0,07 vezes ($P < 0,01$ vs veículo). Os compostos 29, 28, 31 e 30 induziram um aumento na resposta transcricional do ER α de 1,90 \pm 0,11, 2,35 \pm 0,06, 1,70 \pm 0,25 e 2,02 \pm 0,10 vezes, respectivamente ($P < 0,01$ vs veículo e $P < 0,05$ vs estradiol). O aumento na resposta transcricional do ER α obtido na presença das substâncias foi inferior ao obtido com o E₂, mas superior à resposta basal. Logo, todas as substâncias, 29, 28, 31 e 30, tiveram efeito agonista para ER α .

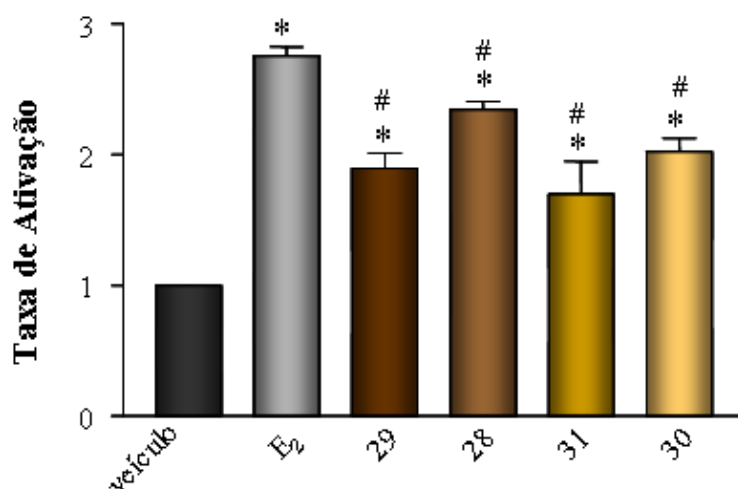


Figura 36. Efeito agonista das substâncias 29, 28, 31 e 30 isoladas de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α . Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do plasmídeo de expressão para ER α e com 3 μ g do plasmídeo que contém o elemento responsivo para o ER ligado ao gene repórter da luciferase - ERE-Luc. As células foram tratadas com veículo (DMSO:EtOH), com controle positivo (estradiol 10⁻⁷mol/L) e com as substâncias 29, 28, 31 e 30 (40 μ g/mL). Após 24 horas, a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. (* $P < 0,01$ vs veículo e # $P < 0,05$ vs estradiol)

4.4.6. Estudo do efeito antagonista das substâncias 29, 28, 31 e 30 isoladas de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada pelo ER α

A partir dos resultados encontrados - ação agonista das substâncias 29, 28, 31 e 30 -, foi pesquisada a ação dessas substâncias na presença do estradiol.

O estradiol isolado induziu um aumento de $2,69 \pm 0,03$ vezes ($p < 0,01$ vs veículo) e as substâncias (concentração de $40\mu\text{g/mL}$) na presença de estradiol induziram um aumento de $2,81 \pm 0,17$, $2,66 \pm 0,09$, $3,12 \pm 0,54$ e $3,17 \pm 0,27$ vezes, respectivamente. Estatisticamente não foi observada diferença entre os resultados encontrados ($P > 0,05$ vs estradiol). Portanto, nas condições analisadas nesse estudo, as substâncias testadas não apresentaram a capacidade de antagonizar o efeito do estradiol sobre o ER α . Os resultados estão apresentados na **Figura 37**.

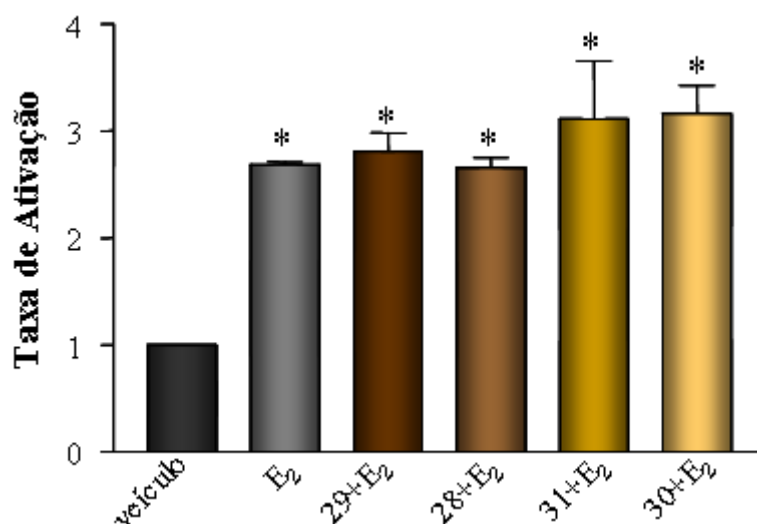


Figura 37. Ausência de efeito antagonista das substâncias 29, 28, 31 e 30 isoladas de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada por ER α . Células U937 foram co-transfectadas com $3\mu\text{g}$ do plasmídeo que contém o elemento responsivo do ER ligado ao gene repórter luciferase (ERE-Luc) e com $2\mu\text{g}$ do plasmídeo de expressão para ER α . Células foram tratadas com E₂ 10^{-7}mol/L (controle positivo) e com as substâncias 29, 28, 31 e 30 ($40\mu\text{g/mL}$) na presença de estradiol (10^{-7}mol/L). Após 24 horas, as células foram lisadas e reagidas com luciferina. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos diferentes. (* $P < 0,01$ vs veículo)

4.4.7. Estudo do efeito agonista das substâncias 29, 28, 31 e 30 isoladas de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada pelo ER β

Foi avaliado também se as substâncias 29, 28, 31 e 30 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) poderiam ter alguma ação sobre a transcrição gênica mediada pelo receptor de estrogênio ER β .

Como mostrado na **Figura 38**, quando comparadas com o veículo, as células tratadas com E₂ induziram uma ativação de $2,86 \pm 0,39$ vezes ($P < 0,01$ vs veículo) e as tratadas com as substâncias induziram uma ativação de $1,79 \pm 0,3$ (29), $1,71 \pm 0,07$ (28), $1,25 \pm 0,17$ (31) e $1,64 \pm 0,1$ (30) vezes ($P > 0,05$ vs veículo), ativações essas que não apresentaram diferença estatística quando comparadas à ativação induzida pelo veículo. Portanto, essas substâncias nas condições analisadas não apresentaram efeito agonista sobre o ER β .

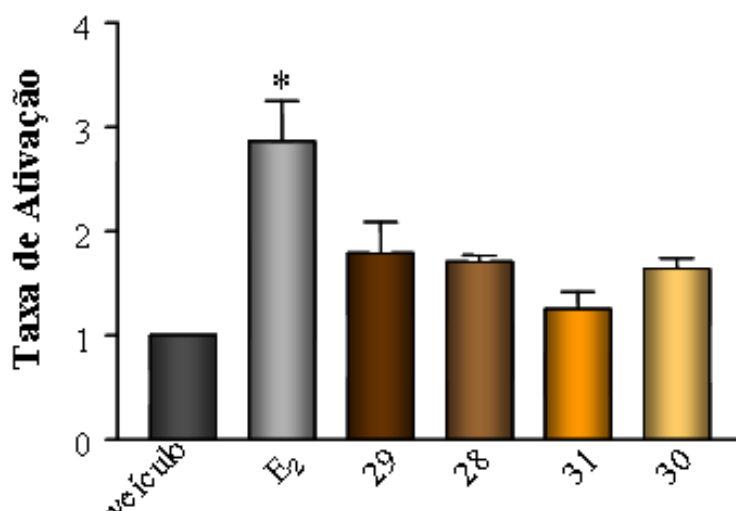


Figura 38. Ausência de efeito agonista das substâncias 29, 28, 31 e 30 isoladas de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada pelo ER β . Células U937 foram co-transfectadas com 2 μg do plasmídeo de expressão para ER β e com 3 μg do plasmídeo que contém o elemento responsivo para o ER ligado ao gene repórter da luciferase - ERE-Luc. As células foram tratadas com veículo (DMSO:EtOH), com controle positivo (estradiol 10^{-7} mol/L) e com as substâncias 29, 28, 31 e 30 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 24 horas a atividade da luciferase foi mensurada. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos. (* $P < 0,01$ vs veículo)

4.4.8. Estudo do efeito antagonista das substâncias 29, 28, 31 e 30 isoladas de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada pelo ER β

As substâncias 29, 28, 31 e 30 não apresentaram efeito agonista para o ER β , foi investigado, portanto, se poderiam ter algum efeito antagonista para esse receptor.

Células U937 tratadas apenas com estradiol, quando comparado com o veículo, tiveram um aumento da atividade transcricional do ER β em $2,86 \pm 0,39$ vezes ($P < 0,01$ vs veículo). A ativação transcricional do ER β na presença de estradiol e também das substâncias 29, 28, 31 e 30 na presença de estradiol foram: $4,77 \pm 0,23$ vezes ($P < 0,05$ vs E₂), $4,2 \pm 0,48$ vezes ($P > 0,05$ vs E₂), $3,95 \pm 0,68$ vezes ($P > 0,05$ vs E₂) e $5,58 \pm 0,02$ vezes ($P < 0,05$ vs E₂), respectivamente.

Interessante notar que as substâncias 29 e 30 mostraram a capacidade de intensificar a atividade transcricional induzida pelo estradiol sobre o ER β . Os resultados estão mostrados na **Figura 39**.

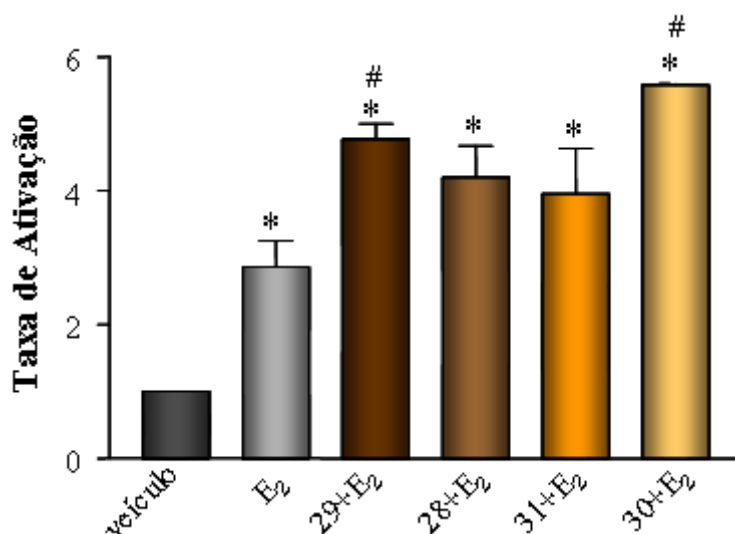


Figura 39. Ausência de efeito antagonista das substâncias 29, 28, 31 e 30 isoladas de *Ipomoea cairica* sobre a atividade transcricional mediada por ER β . Células U937 foram co-transfectadas com 3 μ g do plasmídeo que contém o elemento responsivo do ER ligado ao gene repórter luciferase (ERE-Luc) e com 2 μ g do plasmídeo de expressão para ER β . Células foram tratadas com E₂ 10⁻⁷ mol/L (controle positivo) e com as substâncias 29, 28, 31 e 30 (40 μ g/mL) na presença de estradiol. Após 24 horas as células foram lisadas e reagidas com luciferina. As barras representam a média \pm erro padrão de no mínimo três experimentos diferentes. (* $P < 0,01$ vs veículo e # $P < 0,05$ vs estradiol)

Como conclusão dos experimentos realizados foi verificado que a atividade transcricional induzida pelo estradiol no ER α foi antagonizada na presença do extrato etanólico de *I. cairica* (ICEtOH). As substâncias **29, 28, 31 e 30** (isoladas do ICEtOH), nas condições testadas, não foram as responsáveis por esse efeito. Pelo contrário, todas essas substâncias, quando tiveram suas ações analisadas separadamente, mostraram ação agonista sobre o ER α . As substâncias **29 e 30** foram ainda capazes de intensificar a ação do estradiol sobre o ER β .

O aumento na atividade transcricional induzido pelo estradiol no ER β na presença das substâncias **29 e 30** precisa ser mais investigado para identificar o mecanismo envolvido nesse efeito, visto que a concentração de estradiol usado nos experimentos (10^{-7} mol/L) já é suficiente para induzir a ativação máxima no ER β .

Pode-se inferir que essa resposta - aumento da atividade transcricional do ER β observado com o tratamento de estradiol na presença de **29 e 30** - deve-se à ação das substâncias na conformação do receptor, proporcionando uma maior exposição do sítio de ligação para substâncias agonistas ou proporcionando uma maior ligação de co-ativadores.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O Brasil possui uma grande variedade de plantas superiores. A maioria dessas espécies é usada pelo ser humano como fonte de alimento, de matéria-prima para construção, de medicamentos para cura de enfermidades ou de aromatizantes.

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, as quais são propagadas por usuários e/ou comerciantes (Veiga Jr and Pinto 2005).

O conhecimento tradicional de grupos sociais que fazem uso das plantas é uma fonte essencial para a descoberta dos princípios ativos (substâncias capazes de exercer uma ação de cura) responsáveis pelo combate a doenças. Cabe à comunidade científica a investigação desse conhecimento e uso popular.

Os receptores nucleares estão envolvidos direta e indiretamente em várias patologias. Os avanços nas técnicas químicas e biológicas permitiram a identificação de várias substâncias de origem vegetal com atividade nos receptores nucleares. Dessa forma, compostos isolados de plantas podem representar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de diversas patologias, como por exemplo, osteoporose, depressão, diabetes, cânceres de útero, endométrio e mama.

Além do potencial econômico, o estudo de novos compostos com atividade em receptores nucleares certamente aumentará nossa compreensão sobre a biologia e os mecanismos de ação desses receptores. Também é importante notar que a descoberta de espécies vegetais com propriedades de ativação ou de bloqueio da ação de receptores nucleares trará um novo foco de interesse da indústria farmacêutica para a área de produtos naturais.

As espécies aqui estudadas, *Morus nigra*, *Pouteria torta*, *Plectranthus ornatus* e *Ipomoea cairica* têm uso comum na medicina popular do Brasil e suas ações ainda não são conhecidas nos receptores nucleares.

Em várias regiões do Brasil o chá de folhas de *Morus nigra* é usado por mulheres menopausadas como repositores hormonal e para alívio dos sintomas decorrentes dessa fase (principalmente os fogachos). Até o presente momento essas ações biológicas associadas à *Morus nigra* não foram elucidadas. Considerando que a reposição hormonal e o tratamento dos sintomas da menopausa são realizados com substâncias de ação estrogênica, foi investigado no presente estudo se extratos de folhas de *Morus nigra* poderiam ter ação sobre os receptores de estrogênio (isoformas α e β).

Os resultados obtidos com o uso da metodologia de transfecção e ensaio de gene repórter sugerem que nas condições avaliadas, os extratos aquoso e hexânico de *Morus nigra* são atóxicos para as células U937, no entanto o extrato etanólico dessa espécie mostrou-se tóxico para as células e não foi utilizado nos estudos posteriores com os receptores estrogênicos.

Não foi observada, em nossos resultados, ação dos extratos aquoso e hexânico de *M. nigra* sobre o ER α e ER β . Portanto, nas condições experimentais desse estudo, não foi comprovada a presença nesses extratos de substâncias com ação estrogênica que justifique o uso dessa espécie como repositor hormonal. No entanto, o uso de *M. nigra* no alívio dos fogachos (principal sintoma relatado por mulheres na menopausa), deve ser objeto de futuras investigações, pois os distúrbios endocrinológicos correlacionados com esse sintoma são complexos e, como já citados, o declínio do estrogênio é necessário, mas insuficiente para explicar sua ocorrência. Especula-se também que a causa dos fogachos seja decorrente de uma disfunção do centro de controle de temperatura do corpo e também de alterações do hormônio luteinizante. Consequentemente, os resultados sugerem que, se a *Morus nigra* for capaz de reduzir os fogachos, a ausência de efeito estrogênico observada nesse estudo permitiria sua utilização como uma alternativa terapêutica para mulheres que se encontrem na menopausa e tenham propensão ao desenvolvimento de câncer de mama, os quais em sua maioria são dependentes do estrogênio. Novos estudos são necessários para esclarecer esta questão.

A *Pouteria torta* é uma espécie comum do cerrado e com poucos estudos sobre suas possíveis ações biológicas, o que motivou o presente estudo de sua ação sobre os receptores de estrogênio.

O resultado do estudo de toxicidade dos extratos de *Pouteria torta* (aquoso, etanólico e hexânico) mostrou que eles são atóxicos para as células U937, possibilitando a pesquisa de suas ações nos receptores de estrogênio. Nas condições avaliadas nesse estudo, os extratos aquoso e etanólico não apresentaram ação agonista ou antagonista sobre ER α e ER β . No entanto, os resultados encontrados sugerem que o extrato hexânico possui uma ação antagonista não competitiva para o ER β , pois o esse extrato mostrou-se capaz de inibir o aumento transcricional induzido pelo estradiol no ER β . Essa ação antagonista do extrato hexânico de *P. torta* não foi observada para o ER α .

O ER β é um alvo terapêutico no controle de várias patologias, como depressão, hipertensão, cânceres de próstata e mama, entre outras. A descoberta de substâncias que

atuem nesse receptor desperta grande interesse não somente pela descoberta de novos ligantes para o ER β como também para o desenvolvimento de novos fármacos.

Há vários relatos do uso de espécies de *Plectranthus* na medicina popular, sendo que a maioria desses usos terapêuticos não possui estudos científicos que os comprovem.

Um estudo realizado com *P. barbatus* demonstrou a presença de substâncias com atividade antiinflamatória e estudos recentes realizados com *P. ornatus* demonstraram atividade antinociceptiva. Esses resultados motivaram a realização dos presentes estudos para investigar a possível ação antiinflamatória mediada pelo receptor de glicocorticóide de extratos e substâncias isoladas dessa espécie.

Os resultados obtidos nas condições experimentais deste trabalho mostrou que os extratos hexânico e etanólico de *P. ornatus* e os fitoconstituintes isolados do extrato hexânico - 23, 26 e 27 não apresentaram ação tóxica para as células U937. Nas condições experimentais, os resultados encontrados nos experimentos sugerem que as substâncias isoladas e o extrato etanólico não apresentaram nenhuma atividade sobre o GR e o extrato hexânico demonstrou possuir substâncias com ação agonista sobre o GR. Além disso, é importante relatar que esse extrato foi capaz de intensificar a resposta da atividade transcricional induzida pela dexametasona no GR. A substância e o mecanismo pelo qual ocorreu essa intensificação da resposta da dexametasona até o presente momento não foram esclarecidos. Ensaio posteriores deverão ser realizados para esclarecer esse resultado. Foi também avaliada a ação estrogênica do extrato hexânico de *P. ornatus*, sendo verificado que esse extrato, nas condições analisadas, não possui nenhuma ação agonista ou antagonista sobre ER α e ER β .

Os achados no presente trabalho - ação agonista sobre o receptor de glicocorticóide - corroboram com o uso popular de *Plectranthus ornatus* como antiinflamatório. Estudos futuros deverão ser realizados para tentar identificar as substâncias responsáveis por essa ação agonista sobre o GR, o que pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de processos inflamatórios.

A *Ipomoea cairica* possui várias indicações de seu uso com finalidade terapêutica na medicina popular (anti-reumático, purgativo e antiinflamatório), mas poucos testes biológicos foram realizados com essa espécie. Sabe-se que a família a qual pertence essa espécie, a Convolvulaceae, apresenta vários fitoconstituintes com potencial biológico como, por exemplo, flavonóides e esteróides. A partir dessas informações, foi investigada a ação estrogênica do extrato etanólico e fitoconstituintes isolados desse extrato (29, 28, 31 e 30).

O extrato etanólico e as substâncias **29**, **28**, **31** e **30** isoladas desse extrato mostraram-se atóxicos para as células U937. Os estudos de suas ações sobre ER α e ER β mostraram que o extrato etanólico não apresentou ação sobre o ER β , mas foi capaz de antagonizar o efeito do estradiol em sua ação sobre o ER α . Desta maneira, nas condições experimentais, o extrato etanólico de *Ipomoea cairica* contém substâncias com propriedades antagonistas para esse receptor. Todos os fitoconstituintes testados (**29**, **28**, **31** e **30**) isolados de *I. cairica* apresentaram ação agonista para o ER α , sendo que os fitoconstituintes **28** e **30** foram capazes ainda, quando na presença de estradiol, de intensificarem sua ação sobre esse receptor. O mecanismo pelo qual os fitoconstituintes **28** e **30** foram capazes de intensificar ação do estradiol não foi elucidado neste estudo e testes posteriores deverão ser realizados.

Os achados demonstram que o potencial terapêutico dessa espécie é enorme. O efeito antagonista induzido no ER α pelo extrato etanólico de *Ipomoea cairica* abre um grande campo para a pesquisa de novas substâncias que possam ser usadas nos tratamentos de hiperplasia benigna de próstata, de cânceres de mama e de útero (Gustafsson 2003).

O efeito agonista verificado com as substâncias isoladas do extrato etanólico (**29**, **28**, **31** e **30**) para o ER α indica um grande potencial de essas substâncias serem utilizadas para o tratamento de reposição hormonal em mulheres menopausadas, para prevenção da osteoporose e doenças degenerativas do sistema nervoso central, como Alzheimer (Gustafsson 2003).

Em resumo verifica-se que, nas condições experimentais, das quatro espécies pesquisadas no presente trabalho, três apresentaram atividade em receptores nucleares, sendo que a *Pouteria torta*, e a *Ipomoea cairica* apresentaram ação estrogênica e a *Plectranthus ornatus* apresentou ação sobre o receptor de glicocorticóide.

Dessa forma, espera-se que os resultados aqui apresentados possam aumentar o conhecimento científico sobre a ação de espécies vegetais de nossa flora, utilizadas com finalidade terapêutica e que essas informações contribuam não somente para o descobrimento de novos ligantes para os receptores nucleares, como também para o descobrimento de novos fármacos que tenham sua ação modulada pelos receptores de estrogênios e de glicocorticóide.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Mogib, M., H. A. Albar, et al. (2002). "Chemistry of the Genus *Plectranthus*. ." Molecules **7**: 271-301.
- Abifisa. (2006, 25 de abril de 2006). "Uma Legislação Justa para os Produtos de Origem Natural." from <http://www.abifisa.org.br/introdução.asp>.
- Akiyama, H., S. Barger, et al. (2000). "Inflammation and Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **21**(3): 383-421.
- Alberts, B., D. Bray, et al. (1994). Molecular Biology of The Cell. New York.
- Albuquerque, C. L., M. A. Bortolini Jr., et al. (2002). Inibição da Atividade da alfa-amilase da Saliva Humana por Extratos de Plantas. XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Cuiabá, Livro de Resumos do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil.
- Alexandrova, R., I. Alexandrov, et al. (2000). "Phytoproducts and cancer." Experimental Pathology and Parasitology **4**.
- Alonso, J. R. (1988) "Estudios etnofarmacologicos del genero *Ipomoea*." **Volume**, DOI: www.plantasmedicinales.org/
- Alves, T. M. A., A. F. Silva, et al. (2000). "Biological screening of brazilian medicinal plants." Mem. Inst. Oswaldo Cruz **95**(3): 367-373.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." Physiol Rev **81**(3): 1269-304.
- Barata, L. E. S. and S. R. R. Queiroz (1995). Contribuição Efetiva ou Potencial do PADCT para o Aproveitamento Econômico Sustentável da Biodiversidade. S.-P. d. P. e. G. e. C. e. T. P. Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), do Ministério da Ciência e Tecnologia, Campinas
- Barra, G. B., L. F. Velasco, et al. (2004). "Molecular mechanism of thyroid hormone action." Arq Bras Endocrinol Metabol **48**(1): 25-39.
- Bjornstrom, L. and M. Sjoberg (2004). "Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling." Nucl Recept **2**(1): 3.
- Bourguet, W., P. Germain, et al. (2000). "Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications." Trends Pharmacol Sci **21**(10): 381-8.
- Burkman, R. T. (2003). "Hormone replacement therapy. Current controversies." Minerva Ginecol **55**(2): 107-16.
- Burman, A. (1991). "Saving Brazil's savannas." New Scientist **1758**: 30-34.

- Calixto, J. B., M. F. Otuki, et al. (2003). "Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB)." Planta Med **69**(11): 973-83.
- Carvalho, L. H. (1997). Papel do fator de transcrição NF-kB na reversão fenotípica (tumoral-normal) induzida por glicocorticóides em células C6/ST1 de glioma de rato. Instituto de Química da USP. São Paulo, USP.
- Chagas, F. L., A. L. M. L. Bittencourt, et al. (2003). Avaliações antinociceptivas de espécies de Pouteria. FESBE, Livro resumo da FESBE
- Charmandari, E., T. Kino, et al. (2004). Molecular Mechanisms of Glucocorticoid Action, Orphanet.
- Chawla, A., J. J. Repa, et al. (2001). "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files." Science **294**(5548): 1866-70.
- Chiellini, G., J. W. Apriletti, et al. (1998). "A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor." Chem Biol **5**(6): 299-306.
- Clarkson, T. B., M. S. Anthony, et al. (1998). "The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy." Proc Soc Exp Biol Med **217**(3): 365-8.
- Codd, L. E. (1985). Flora of Southern Africa. Botanical Research Institute, Department of Agriculture and Water Supply. **28**: 137-151.
- Corrêa, A. D., R. S. Batista, et al. (1998). Plantas Medicinais. Rio de Janeiro.
- Couse, J. F. and K. S. Korach (1999). "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?" Endocr Rev **20**(3): 358-417.
- Cragg, G. M. and D. J. Newman (1999). "Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources." Cancer Invest **17**(2): 153-63.
- Cragg, G. M., D. J. Newman, et al. (1997). "Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents." Semin Oncol **24**(2): 156-63.
- Curcio, J. J., L. S. Kim, et al. (2005). "The potential of 5-hydroxytryptophan for hot flash reduction: a hypothesis." Altern Med Rev **10**(3): 216-21.
- David, V. (1993). Aplicação de técnicas cromatográficas na separação e determinação de triterpenos e hidrocarbonetos presentes nas flores, frutos e xilopódio de *Pouteria torta*. São Carlos, Universidade Federal de São Carlos.
- de Souza, M. M., M. Bittar, et al. (2000). "Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark." Z Naturforsch [C] **55**(3-4): 256-60.

- Dellar, J. E., M. D. Cole, et al. (1996). "Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*." Phytochemistry **41**(3): 735-8.
- Diaz, L. K. and N. Sneige (2005). "Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy." Adv Anat Pathol **12**(1): 10-9.
- Escriva, H., R. Safi, et al. (1997). "Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6803-8.
- Finsterbusch, A., P. Lindemann, et al. (1999). "Delta(5)-3beta-hydroxysteroid dehydrogenase from *Digitalis lanata* Ehrh. - a multifunctional enzyme in steroid metabolism?" Planta **209**(4): 478-86.
- Forman, B. M., P. Tontonoz, et al. (1995). "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma." Cell **83**(5): 803-12.
- Franco, I. J. (1997). Erva E Planta – A Medicina Dos Simples.
- Giguere, V. (1999). "Orphan nuclear receptors: from gene to function." Endocr Rev **20**(5): 689-725.
- Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). "The co-regulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." Genes Dev **14**: 121-41.
- Gronemeyer, H., J. A. Gustafsson, et al. (2004). "Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily." Nat Rev Drug Discov **3**(11): 950-64.
- Gupta, B. B. P. and K. Lalchandama (2002). "Molecular mechanisms of glucocorticoid action." Current Science **83**(9): 1103 - 1111.
- Gustafsson, J. A. (1999). "Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action." J Endocrinol **163**(3): 379-83.
- Gustafsson, J. A. (2003). "What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling." Trends Pharmacol Sci **24**(9): 479-85.
- Hamburger, M. and K. Hostettman (1991). "Bioactive in plants: the link between phytochemistry and medicine." Phytochemistry **30**(12): 3864-3874.
- Hodgkin, J. (1999). "Sex, cell death, and the genome of *C. elegans*." Cell **98**(3): 277-80.
- Howell, S. J., S. R. Johnston, et al. (2004). "The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **18**(1): 47-66.
- Ingram, D., K. Sanders, et al. (1997). "Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer." Lancet **350**(9083): 990-4.
- Janeczko, A. and A. Skoczowski (2005). "Mammalian sex hormones in plants." Folia Histochem Cytobiol **43**(2): 71-9.

- Juch, M. and P. Ruedi (1997). "Isolation, Structure, and Biological activities of long-chain catechols of *Plectranthus sylvestris* (Labiatae). ." Helv Chim Acta **80**(2): 436-448.
- Kliwer, S. A., J. M. Lehmann, et al. (1999). "Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse." Science **284**(5415): 757-60.
- Kliwer, S. A., H. E. Xu, et al. (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology." Recent Prog Horm Res **56**: 239-63.
- Krasowski, M. D., K. Yasuda, et al. (2005). "Evolutionary selection across the nuclear hormone receptor superfamily with a focus on the NR1I subfamily (vitamin D, pregnane X, and constitutive androstane receptors)." Nucl Recept **3**: 2.
- Laudet, V. and H. Gronemeyer (2001). The Nuclear Receptors Factbooks. San Diego.
- Lima, O. A. and R. J. Braz-Filho (1997). "Dibenzylbutyrolactone Lignans And Coumarins From *Ipomoea Cairica*." Braz. Chem. Soc. **8**(3): 235-238.
- Lukhoba, C. W., M. S. Simmonds, et al. (2006). "Plectranthus: a review of ethnobotanical uses." J Ethnopharmacol **103**(1): 1-24.
- Lupu, R., I. Mehmi, et al. (2003). "Black cohosh, a menopausal remedy, does not have estrogenic activity and does not promote breast cancer cell growth." International Journal of Oncology **23**: 1407-12.
- Maciel, M. A., A. C. Pinto, et al. (2000). "Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*." J Ethnopharmacol **70**(1): 41-55.
- Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell **83**(6): 841-50.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell **83**(6): 835-9.
- Matu, E. N. and J. van Staden (2003). "Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya." J Ethnopharmacol **87**(1): 35-41.
- Mayo, J. L. (1999). "A Natural Approach to Menopause." Applied Nutritional Science Reports **5**(7): 1-8.
- McDonnell, D. P., A. Wijayaratne, et al. (2002). "Elucidation of the molecular mechanism of action of selective estrogen receptor modulators." Am J Cardiol **90**(1A): 35F-43F.
- McKenna, N. J., R. B. Lanz, et al. (1999). "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology." Endocr Rev **20**(3): 321-44.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." Cell **108**(4): 465-74.

- Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, et al. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." Pharmacol Rev **52**(4): 673-751.
- Miller, L. G. (1998). "Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions." Arch Intern Med **158**(20): 2200-11.
- Mincu, I., C. Ionescu-Tirgoviste, et al. (1989). "[Diabetic neuropathy: clinical and electrophysiologic results of the use of a plant extract rich in myoinositol]." Rev Med Interna Neurol Psihiatr Neurochir Dermatovenerol Med Interna **41**(3): 265-9.
- Moore, L. B., B. Goodwin, et al. (2000). "St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7500-2.
- Mourits, M. J., I. Bockermann, et al. (2002). "Tamoxifen effects on subjective and psychosexual well-being, in a randomised breast cancer study comparing high-dose and standard-dose chemotherapy." Br J Cancer **86**(10): 1546-50.
- Murphy, E. K., R. L. Spencer, et al. (2002). "Decrements in nuclear glucocorticoid receptor (GR) protein levels and DNA binding in aged rat hippocampus." Endocrinology **143**(4): 1362-70.
- Naderi, G. A., S. Asgary, et al. (2004). "Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*." Phytother Res **18**(5): 365-9.
- Neves, F. A. R., P. Webb, et al. (2002). Syndrome of Resistance to glucocorticoid and mineralocorticoid hormones.
- New, D. C. and Miller-Martini (2003). "Reporter gene assays and their applications to bioassays of natural products " Phytotherapy research **17** (5): 439-448.
- Nilsson, S. and J. A. Gustafsson (2000). "Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action." Breast Cancer Res **2**(5): 360-6.
- Nomura, T. and Y. Hano (1994). "Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants." Nat Prod Rep **11**(2): 205-18.
- Nystedt, M., G. Berglund, et al. (2003). "Side effects of adjuvant endocrine treatment in premenopausal breast cancer patients: a prospective randomized study." J Clin Oncol **21**(9): 1836-44.
- Oliveira, P. M., A. A. Ferreira, et al. (2005). "Diterpenoids from the aerial parts of *Plectranthus ornatus*." J Nat Prod **68**(4): 588-91.
- Oryan, S., M. Eidi, et al. (2003). "Hypoglycaemic effect of alcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves in normal and diabetic rats." J. of Medical Plants **2** 27-32.
- Osborne, C. K., H. Zhao, et al. (2000). "Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use." J Clin Oncol **18**(17): 3172-86.

- Paska, C., G. Innocenti, et al. (2002). "Pinoresinol from *Ipomoea cairica* cell cultures." Nat Prod Lett **16**(5): 359-63.
- Pierreux, C. E., J. Stafford, et al. (1999). "Antiglucocorticoid activity of hepatocyte nuclear factor-6." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8961-6.
- Pike, A. C., A. M. Brzozowski, et al. (1999). "Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist." Embo J **18**(17): 4608-18.
- Pinzone, J. J., H. Stevenson, et al. (2004). "Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression." Mol Cell Biol **24**(11): 4605-12.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft (1997). "Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones." Endocr Rev **18**(3): 306-60.
- Procópio, S. O., E. A. Ferreira, et al. (2003). "Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. III - *Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* e *Ipomoea cairica*." Planta daninha **21**(1).
- Quer, P. F. (1995). Plantas medicinales El Dioscórides renovado.
- Rasikari, H. L., D. N. Leach, et al. (2005). "Acaricidal and cytotoxic activities of extracts from selected genera of Australian Lamiaceae." J Econ Entomol **98**(4): 1259-66.
- Rates, S. M. K. (2001). "Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia." Revista Brasileira de Farmacognosia **11**(2): 57-69.
- Ribeiro, R. C., J. W. Apriletti, et al. (1998). "Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies." Recent Prog Horm Res **53**: 351-92; discussion 392-4.
- Robinson-Rechavi, M., A. S. Carpentier, et al. (2001). "How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?" Trends Genet **17**(10): 554-6.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." Jama **288**(3): 321-33.
- Schroder, H. C., H. Merz, et al. (1990). "Differential in vitro anti-HIV activity of natural lignans." Z Naturforsch [C] **45**(11-12): 1215-21.
- Sladek, F. M. (2003). "Nuclear receptors as drug targets: new developments in coregulators, orphan receptors and major therapeutic areas." Expert Opin Ther Targets **7**(5): 679-84.
- Srivastava, K. C., A. Bordia, et al. (1995). "Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **52**(4): 223-7.

- Sugimoto, L. (2003) ""Desarmando a Ratoeira Hormonal"." Jornal da Unicamp **Volume**, 03
DOI:
- Synold, T. W., I. Dussault, et al. (2001). "The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux." Nat Med **7**(5): 584-90.
- Taylor, A. H. and F. Al-Azzawi (2000). "Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues." J Mol Endocrinol **24**(1): 145-55.
- Thomas, T. G., S. Rao, et al. (2004). "Mosquito larvicidal properties of essential oil of an indigenous plant, Ipomoea cairica Linn." Jpn J Infect Dis **57**(4): 176-7.
- Tremblay, A., G. B. Tremblay, et al. (1998). "EM-800, a novel antiestrogen, acts as a pure antagonist of the transcriptional functions of estrogen receptors alpha and beta." Endocrinology **139**(1): 111-8.
- Tuckermann, J. P., H. M. Reichardt, et al. (1999). "The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin." J Cell Biol **147**(7): 1365-70.
- Umesono, K. and R. M. Evans (1989). "Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors." Cell **57**(7): 1139-46.
- Urizar, N. L., A. B. Liverman, et al. (2002). "A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR." Science **296**(5573): 1703-6.
- Veiga Jr, V. F. and A. C. Pinto (2005). "Plantas Mediciniais: Cura Segura?" Química Nova **28**(3): 519-528.
- Verheggen, M. M., P. T. van Hal, et al. (1996). "Modulation of glucocorticoid receptor expression in human bronchial epithelial cell lines by IL-1 beta, TNF-alpha and LPS." Eur Respir J **9**(10): 2036-43.
- Vogel, C. L. (2003). "Update on the current use of hormonals as therapy in advanced breast cancer. ." Anti-Cancer Drugs. **14**(4): 265-273.
- Warnmark, A., E. Treuter, et al. (2003). "Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation." Mol Endocrinol **17**(10): 1901-9.
- Warriar, N., N. Page, et al. (1996). "Expression of human glucocorticoid receptor gene and interaction of nuclear proteins with the transcriptional control element." J Biol Chem **271**(31): 18662-71.
- White, R. and M. G. Parker (1998). "Molecular mechanisms of steroid hormone action." Endocrine-Related Cancer **5**: 1-14.
- Wu, Y., B. Xu, et al. (2001). "Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness." J Biol Chem **276**(6): 3929-36.

- Yen, P. M. (2001). "Physiological and molecular basis of thyroid hormone action." Physiol Rev **81**(3): 1097-142.
- Zhao, L. and R. D. Brinton (2005). "Structure-based virtual screening for plant-based ERbeta-selective ligands as potential preventative therapy against age-related neurodegenerative diseases." J Med Chem **48**(10): 3463-6.
- Zhao, L., T. W. Wu, et al. (2004). "Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons." Brain Res **1010**(1-2): 22-34.