

Clarissa Feltrin

**INTERAÇÕES ENTRE PLANTAS MEDICINAIS E FÁRMACOS:
AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS NO TRANSPORTE
BIDIRECIONAL, EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA EM
CÉLULAS CACO-2 E NA BIOTRANSFORMAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutora em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Feltrin, Clarissa

Interações entre plantas medicinais e fármacos: avaliação dos seus efeitos no transporte bidirecional, expressão gênica e proteica em células Caco-2 e na biotransformação / Clarissa Feltrin; orientadora, Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Oliveira Simões, 2018.

329 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Plantas medicinais. 3. Células Caco-2. 4. Glicoproteína-P. 5. BCRP. 6. CYP3A4. CYP2D6. I. Simões, Cláudia Maria Oliveira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Clarissa Feltrin

**INTERAÇÕES ENTRE PLANTAS MEDICINAIS E FÁRMACOS:
AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS NO TRANSPORTE
BIDIRECIONAL, EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA EM
CÉLULAS CACO-2 E NA BIOTRANSFORMAÇÃO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Doutora em Farmácia” e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Florianópolis, 14 de agosto de 2018.

Prof.^a Dr.^a Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Oliveira Simões
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof.^a Dr.^a Patrícia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Thiago Caon
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida, ao CNPq pelo financiamento deste trabalho e à UFSC, extensão da minha casa nos últimos doze anos, pela oportunidade de fazer parte desta Instituição.

Minha gratidão aos professores e alunos dos Laboratórios de Farmacognosia e de Química Farmacêutica, em especial aos Professores Flávio Reginatto e Louis Sandjo pela doação de materiais e apoio técnico. Muito obrigada aos professores e alunos do Laboratório de Protozoologia, principalmente à Professora Patrícia Hermes Stoco pela doação de materiais e por sua importante colaboração. Obrigada também aos demais integrantes de outros laboratórios desta Instituição que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

O meu obrigada aos técnicos dos laboratórios multiusuário LAMEB e CEBIME pela atenção e auxílio. Agradeço também à empresa Nortec Química e à Larissa Frankenberger da VitalFarm pela doação de materiais.

Agradeço à UFMG, ao Professor Fernão Castro Braga e à Professora Izabella Thaís da Silva por me receberem com tanto carinho em seu laboratório e em sua casa durante minha estada em Belo Horizonte. Agradeço também ao Professor Rodrigo Maia de Pádua, à técnica Juliana Rapozo e ao doutorando José Hugo Gomes pelo apoio e auxílio. Meu agradecimento aos amigos que fiz em Belo Horizonte por todo apoio e gentileza. Foi um prazer ter tido a oportunidade de conhecê-los!

Agradeço à parceira de longa data, Professora Thaís Cristine Marques Sincero pela atenção e pelas contribuições. Obrigada também à nova parceira, Daniele Hamamoto, sua generosidade e disposição foram fundamentais para que parte deste trabalho fosse realizada.

Muito obrigada aos colegas e amigos com quem convivi nestes sete anos de LVA. Um agradecimento especial à Paula Freire Brambila, aluna de iniciação científica, que me acompanhou dedicadamente durante o meu doutorado. Sua ajuda foi essencial! O meu obrigada também ao Dr. Jadel Müller Kratz, que sugeriu o ponto de partida que deu origem a este trabalho.

Agradeço muito à minha orientadora Professora Cláudia Maria Oliveira Simões pela oportunidade, pela orientação, pelo

apoio e por ter acreditado em mim. Sua motivação e seu conhecimento sempre nos inspiram!

Minha gratidão a todos os meus familiares, principalmente aos meus tios Carmem e Waldy e à minha prima Hanna por me acolherem durante doze anos na sua casa e por todo o apoio.

Agradeço muitíssimo aos meus pais, Maria Eliza e Luiz Antonio, obrigada por compreenderem a minha ausência, por acreditarem em mim e nos meus sonhos, por me apoiarem e por sempre terem sido pais maravilhosos. Vocês são o motivo de tudo! Amo vocês!

Por fim, agradeço à Deus, pelas graças diárias e por colocar pessoas tão especiais em minha vida.

RESUMO

O uso de Terapias Alternativas e Complementares vem crescendo em todo o mundo e, recentemente, a OMS e demais agências de saúde internacionais têm adotado iniciativas para incentivar essas práticas a fim de promover o bem-estar e a saúde pública. No entanto, o uso indiscriminado de plantas medicinais e fármacos concomitantemente pode resultar em interações, as quais podem causar flutuações na biodisponibilidade dos fármacos e consequente falha terapêutica e/ou efeitos tóxicos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de interações entre plantas medicinais e fármacos *in vitro*. Extratos padronizados de dez plantas medicinais (*Cynara scolymus*; *Matricaria recutita*; *Camellia sinensis*; *Cecropia glaziovii*; *Echinacea* sp.; *Cimicifuga racemosa*; *Ilex paraguariensis*; *Ginkgo biloba*; *Bauhinia forficata* e *Glycine max*) foram investigados quanto ao seu potencial em causar interações. Para esse propósito, foram utilizados ensaios com células Caco-2 em modelo *Transwell*, enzima CYP2D6 recombinante, sistemas repórteres, RT-qPCR e quantificação proteica. Entre os extratos testados, os de *Camellia sinensis*, *Cecropia glaziovii* e *Echinacea* sp. reduziram a permeabilidade da quinidina e o de *Matricaria recutita* induziu o efluxo desse fármaco. Todos os extratos testados, exceto os de *Camellia sinensis*, *Cimicifuga racemosa* e *Bauhinia forficata*, reduziram a permeabilidade da sulfasalazina, enquanto o de *Cimicifuga racemosa* aumentou a permeabilidade e o de *Matricaria recutita* também reduziu o efluxo deste fármaco no modelo *Transwell*. Utilizando CYP2D6 recombinante, os extratos de *Camellia sinensis* e *Cecropia glaziovii* inibiram a atividade dessa enzima. Em sistemas repórteres, os extratos de *Matricaria recutita*, *Cecropia glaziovii*, *Echinacea* sp. e *Bauhinia forficata* induziram a expressão da CYP3A4, e os de *Cynara scolymus*, *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Ginkgo biloba*, *Bauhinia forficata* e *Glycine max* inibiram a expressão da CYP2D6. Por RT-qPCR, o extrato de *Camellia sinensis* induziu e o de *Ginkgo biloba* inibiu a expressão de *ABCB1*, enquanto que os extratos de *Camellia sinensis*, *Cimicifuga racemosa*, *Bauhinia forficata* e *Glycine max* induziram, e o de *Cynara scolymus* inibiu a expressão de *ABCG2*. Além disso, o extrato de *Matricaria recutita* induziu a expressão da CYP2D6. Pela quantificação de proteínas, os extratos de *Camellia sinensis* e *Cecropia glaziovii* induziram a

expressão da P-gp, e todos os extratos, exceto o de *Bauhinia forficata*, induziram a expressão da BCRP. Assim, alguns dos extratos testados demonstraram modulação *in vitro* da atividade e/ou da expressão de transportadores e enzimas envolvidas em interações entre plantas medicinais e fármacos, o que pode ocorrer também *in vivo*. De tal modo, é necessária cautela no uso dessas plantas medicinais e seus derivados, e futuras investigações *in vivo* e clínicas devem ser realizadas para assegurar o uso seguro da fitoterapia.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Células Caco-2; Glicoproteína-P; BCRP; CYP3A4; CYP2D6.

ABSTRACT

The use of CAM has been growing worldwide, and the OMS and other international health agencies have recently taken initiatives to encourage these practices in order to promote well-being and public health. However, the indiscriminate use of medicinal plants concomitantly with conventional drugs may result in herb-drug interactions that can cause fluctuations in drug bioavailability and consequent therapeutic failure and/or toxic effects. Thus, the aim of the present study was to evaluate the occurrence of herb-drug interactions *in vitro*. Standardized extracts of ten medicinal plants (*Cynara scolymus*; *Matricaria recutita*; *Camellia sinensis*; *Cecropia glaziovii*; *Echinacea* sp.; *Cimicifuga racemosa*; *Ilex paraguariensis*; *Ginkgo biloba*; *Bauhinia forficata* and *Glycine max*) were investigated for their potential to cause interactions. For this purpose, Caco-2 cells cultured in the Transwell model, CYP2D6 recombinant enzyme, Caco-2 cells-based gene reporter, RT-qPCR, and protein labeling assays were used. Among the extracts tested, those obtained with *Camellia sinensis*, *Cecropia glaziovii* and *Echinacea* sp. reduced the permeability of quinidine, and *Matricaria recutita* induced drug efflux. All extracts tested, except *Camellia sinensis*, *Cimicifuga racemosa*, and *Bauhinia forficata*, reduced the permeability of sulfasalazine, while *Cimicifuga racemosa* increased permeability and *Matricaria recutita* also reduced the efflux of this drug in a Transwell assay. Using CYP2D6 recombinant enzyme, *Camellia sinensis* and *Cecropia glaziovii* inhibited CYP2D6 activity. Using Caco-2 cells-based gene reporter assay, the extracts of *Matricaria recutita*, *Cecropia glaziovii*, *Echinacea* sp., and *Bauhinia forficata* increased CYP3A4 expression, and those of *Cynara scolymus*, *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Ginkgo biloba*, *Bauhinia forficata*, and *Glycine max* decreased CYP2D6 expression. Using RT-qPCR, *Camellia sinensis* and *Ginkgo biloba* increased and reduced, respectively, the *ABCB1* expression, while *Camellia sinensis*, *Cimicifuga racemosa*, *Bauhinia forficata* and *Glycine max* increased, and *Cynara scolymus* reduced *ABCG2* expression, respectively. Furthermore, *Matricaria recutita* increased CYP2D6 expression. By using protein labeling assay, *Camellia sinensis* and *Cecropia glaziovii* increased P-gp expression, and all extracts, except *Bauhinia forficata*, increased BCRP expression. Thus, some of the extracts tested demonstrated *in vitro* modulation of the activity

and/or the expression of transporters and enzymes involved in herb-drug interactions, which could occur also *in vivo*. Thus, caution is needed in the use of medicinal plants and their derivatives, and further *in vivo* and clinical investigations are also needed to ensure the safe use of phytotherapy.

Keywords: Medicinal plants; Caco-2 cells; P-glycoprotein; BCRP; CYP3A4; CYP2D6.

LISTA DE FIGURAS

Figura I. 1 - Cronologia das ações públicas para o incentivo e a valorização do uso das TAC no Brasil.	39
Figura I. 2 - Metabolismo pré-sistêmico e parâmetros farmacocinéticos que podem ser modulados por plantas medicinais.	45
Figura I. 3 - Mecanismos de transporte envolvidos na absorção intestinal.	47
Figura I. 4 - Transportadores atuantes na absorção intestinal de fármacos.	48
Figura I. 5 - Estrutura dos transportadores OCT.	51
Figura I. 6 - Estrutura dos transportadores OATP.	54
Figura I. 7 - Estrutura da P-gp.	57
Figura I. 8 - Estrutura da BCRP.	61
Figura II. 1 - Perfis cromatográficos e espectros no UV dos compostos majoritários detectados nos extratos das plantas medicinais selecionadas para este estudo.	108
Figura II. 2 - Citotoxicidade dos extratos em células Caco-2 após 6 h de tratamento.	124
Figura II. 3 - Citotoxicidade dos extratos em células Caco-2 após 24 h de tratamento.	126
Figura II. 4 - Citotoxicidade dos extratos em células Caco-2 após 48 h de tratamento.	128
Figura II. 5 - Citotoxicidade dos fármacos quinidina, sulfassalazina e rifampicina, em células Caco-2, após 6 h ou 24 h e 48 h de tratamento.	131
Figura III. 1 - Ilustração do ensaio de permeabilidade do <i>Lucifer yellow</i> (LY).	144
Figura III. 2 - Ilustração do sistema <i>Transwell</i> para estudo de transporte bidirecional com células Caco-2.	147
Figura III. 3 - Valores da TEER mensurados em insertos contendo células Caco-2, pré-incubadas por 21 a 25 dias nas condições padrão de cultivo.	154
Figura III. 4 - Curva de calibração do <i>Lucifer Yellow</i>	155
Figura III. 5 - Valores de P_{app} do marcador de alta permeabilidade propranolol.	156

Figura III. 6 - Microscopia de fluorescência de monocamadas de células Caco-2 marcadas com anticorpos Anti-ZO-1 e coradas com rodamina-faloidina.....	157
Figura III. 7 - Solventes testados para a preparação das amostras anteriormente à injeção no equipamento de CLUE-EM/EM.....	161
Figura III. 8 - Cromatogramas e espectros dos fármacos marcadores obtidos utilizando o método de CLUE-EM/EM desenvolvido.	164
Figura III. 9 - Cromatogramas do tampão HBSS e das soluções dos extratos analisados pelo método de CLUE-EM/EM desenvolvido.	169
Figura III. 10 - Curvas de quantificação dos fármacos marcadores para determinação do efeito matriz.	172
Figura III. 11 - Modulação da P_{app} (cm/s) da quinidina pelos extratos das plantas medicinais em estudo.....	177
Figura III. 12 - Modulação da P_{app} (cm/s) da sulfassalazina pelos extratos de plantas medicinais em estudo.....	182
Figure 1 - Probe drug and metabolites detected by UHPLC-MS and substrate saturation curve data.....	211
Figure 2 - Potential alterations on CYP2D6 enzymatic activity in the presence of medicinal plant standardized extracts.....	214
Figure 3 - <i>Camellia sinensis</i> (A) and <i>Cecropia glaziovii</i> (B) inhibition curves.....	216
Figure 4 - Chromatograms of <i>Camellia sinensis</i> (CSi) and <i>Cecropia glaziovii</i> (CG) obtained by UHPLC-MS/MS for their major compounds identification.	217
Figura V. 1 - Ilustração da estrutura do vetor pZsGreen1-1 e da localização dos sítios de restrição no sítio múltiplo de clonagem.	243
Figura V. 2 - Esquema das técnicas utilizadas no desenvolvimento e do método de análise da modulação dos sistemas repórteres.....	249
Figura V. 3 - Eletroforese dos produtos de PCR, CYP3A4 e CYP2D6.....	251
Figura V. 4 - Microscopia da monocamada de células dos sistemas repórteres CYP3A4 e CYP2D6 em comparação ao controle ZsGreen1-1.	252

Figura V. 5 - <i>Dot plots</i> e histogramas obtidos por citometria de fluxo para os sistemas repórteres.	254
Figura V. 6 - Intensidade de fluorescência dos sistemas repórter após 48 h e 21-25 dias de pré-incubação.....	255
Figura V. 7 - Curva de tempo de pré-incubação dos sistemas (A) CYP3A4 ZsGreen1-1 (B) CYP2D6 ZsGreen1-1.....	257
Figura V. 8 - Expressão de fluorescência do sistema controle (ZsGreen1-1) tratado com as diferentes amostras após 48 h (A) e 21-25 (B) dias de pré-incubação das células Caco-2.....	258
Figura V. 9 - Expressão de fluorescência dos sistemas CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1 após o tratamento de células diferenciadas com rifampicina 100 µM.	260
Figura V. 10 - Modulação da expressão da fluorescência após 24 h de tratamento das células não diferenciadas do sistema CYP3A4 ZsGreen1-1.	262
Figura V. 11 - Modulação da expressão da fluorescência após 24 h de tratamento das células não diferenciadas do sistema CYP2D6 ZsGreen1-1.	263
Figura V. 12 - Modulação da expressão da fluorescência após 48 h de tratamento das células diferenciadas do sistema CYP3A4 ZsGreen1-1.	265
Figura V. 13 - Modulação da expressão da fluorescência após 48 h de tratamento das células diferenciadas do sistema CYP2D6 ZsGreen1-1.	269
Figura VI. 1 - Bandas dos produtos obtidos por RT seguida de PCR convencional em gel de poliacrilamida 10%.	292
Figura VI. 2 - Expressão dos genes (A) CYP3A4 e (B) CYP2D6 em células Caco-2, após o tratamento com os extratos das plantas medicinais em estudo.	296
Figura VI. 3 - Expressão dos genes (A) ABCB1 e (B) ABCG2 em células Caco-2, após o tratamento com os extratos das plantas medicinais em estudo.....	297
Figura VI. 4 - Avaliação da interferência dos extratos em estudo na análise da fluorescência das células por citometria de fluxo em comparação com os controles celulares não tratados e não marcados com anticorpos.	304
Figura VI. 5 - Expressão proteica da P-gp e da BCRP avaliada por citometria de fluxo.	305

Figura VI. 6 - Ilustrações representando o esquema de tratamento utilizado (A) e o atraso entre a expressão gênica e proteica (B).....	313
Figura VI. 7 - Relações entre as expressões proteica e gênica dos transportadores (A) P-gp e (B) BCRP, após o tratamento das células Caco-2 com os extratos das plantas medicinais em estudo.....	315

LISTA DE QUADROS

Quadro I. 1 - Plantas medicinais selecionadas, indicações de uso e efeitos farmacológicos comprovados.....	70
Quadro II. 1 - Informações sobre as plantas medicinais selecionadas para o estudo.	104
Quadro II. 2 - Sugestão dos compostos presentes nos extratos em estudo de acordo com o perfil dos espectros cromatográficos no UV.....	118
Quadro III. 1 - Particularidades do ensaio de transporte bidirecional com células Caco-2.	148
Quadro III. 2 - Parâmetros espectrométricos utilizados para detecção e quantificação dos fármacos marcadores (ESI +)...	151
Quadro III. 3 - Solventes e combinações de solventes testados para a extração/purificação das amostras de quinidina em tampão HBSS.....	160
Quadro III. 4 - Resultados da análise de robustez do método de CLUE-EM/EM desenvolvido.....	174
Quadro V. 1 - Iniciadores utilizados para a produção dos sistemas repórteres CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1.....	242
Quadro V. 2 - Particularidades das reações de digestão dos produtos de PCR (CYP3A4 e CYP2D6) e do vetor ZsGreen1-1.	245
Quadro V. 3 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de modulação dos sistemas repórteres.	248
Quadro VI. 1 - Iniciadores e sondas de hidrólise desenhados para os estudos de expressão dos genes <i>ABCB1</i> , <i>ABCG2</i> , <i>CYP3A4</i> e <i>CYP2D6</i> por RT-qPCR.....	287
Quadro VI. 2 - Condições utilizadas nas reações de RT-qPCR.	289

LISTA DE TABELAS

Tabela II. 1 - Citotoxicidade dos extratos em células Caco-2, após incubação por 6 h, 24 h e 48 h.....	123
Tabela III. 1 - Dados da validação parcial do método analítico por CLUE-EM/EM utilizado para as análises de extração/purificação das amostras de quinidina.	162
Tabela III. 2 - Dados de validação do método de detecção e quantificação por CLUE-EM/EM dos fármacos marcadores quinidina, sulfassalazina e propranolol.	167
Table 1 - Drug probe (metoprolol) and metabolites chemical characteristics.....	212
Table 2 - Characterization of the major phytoconstituents of CSi (<i>Camellia sinensis</i>) standardized extract.	219
Table 3 - Characterization of the major phytoconstituents of CG (<i>Cecropia glaziovii</i>) standardized extract.	221
Table 4 - Tested standardized extracts.	225
Tabela V. 1 - Resumo dos efeitos dos tratamentos em células dos sistemas repórteres não diferenciadas e diferenciadas.	271
Tabela VI. 1 - Dados das curvas de amplificação obtidas por RT-qPCR.	295
Tabela VI. 2 - Modulação da expressão gênica e proteica dos transportadores P-gp e BCRP pelos extratos das plantas medicinais em estudo.....	311
Tabela 1 - Resumo dos resultados da modulação da expressão e da função dos transportadores e enzimas pelos extratos das plantas medicinais em estudo e pelos controles.	329

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - *ATP-Binding Cassette*
ABCB1 - ATP-Binding Cassette subfamília B membro 1
ABCG2 - ATP-Binding Cassette subfamília G membro 2
ACTB - β -actina
AhR - *Aryl hydrocarbon Receptor*
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-BL - Apical- basolateral
ATCC - *American Type Culture Collection*
ATP - Adenosina trifosfato
BCRP - *Breast Cancer Resistance Protein*
BF - *Bauhinia forficata*
BL-AP - Basolateral-apical
BSA - *Bovine Serum Albumin*
CAR - *Constitutive Androstane Receptor*
CC - Controle celular
CEPON - Centro de Pesquisas Oncológicas
CG - *Cecropia glaziovii*
CG% - % de citosina e guanina
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
C_q - Ciclo de quantificação
CR - *Cimicifuga racemosa*
CSc - *Cynara scolymus*
CSi - *Camellia sinensis*
Curc - Curcumina
CYP2D1 - Citocromo P450 família 2 subfamília D membro 1
CYP2D6 - Citocromo P450 família 2 subfamília D membro 6
CYP3A1 - Citocromo P450 família 3 subfamília A membro 1
CYP3A4 - Citocromo P450 família 3 subfamília A membro 4
CYP450 - Citocromo P450
DAD - Detector de Arranjos Diodo
DEPC - Dicarbonato de etila
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNAC - Ácido desoxirribonucleico complementar
dNTP - Desoxinucleotídeos trifosfato
DPR - Desvio Padrão Relativo
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM - Espectrometria de massas

EMA - *European Medicines Agency*
EQ - *Echinacea* sp.
ESI - Ionização Eletrospray
FDA - *Food and Drug Administration*
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
FSC - *Forward Scatter*
G418 - Geneticin®
GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GB - *Ginkgo biloba*
GFP - *Green Fluorescent Protein*
GM - *Glycine max*
Halo - Haloperidol
HBSS - *Hank's balanced salt solution*
HNF4 α - *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*
IC₅₀ - Concentração inibitória 50%
INCQ - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ITC - *International Transporter Consortium*
IP - *Ilex paraguariensis*
LB - Luria - Bertani
LD - Limite de Detecção
LQ - Limite de Quantificação
LY - *Lucifer Yellow*
MDR1 - *Multi-Drug Resistance 1*
MR - *Matricaria recutita*
MRP2 - *Multidrug resistance protein 2*
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBD - Domínios de ligação de nucleotídeos
NCCIH - *National Center for Complementary and Integrative Health*
NIH - National Institutes of Health
OATP - *Organic Anion Transporting Polypeptide*
OCT - *Organic Cation Transporters*
OMS - Organização Mundial da Saúde
P_{app} - Permeabilidade aparente
pb - pares de base
PBS - Tampão fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PDA - Detector de Arranjos Fotodiodos
PE - Ficoeritrina
P-gp - Glicoproteína P
PI - Padrão interno

PM - Padrão de peso molecular
PS - Solução de penicilina e estreptomicina
PXR - *Pregnane X Receptor*
QToF - *Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry*
RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde
Rif - Rifampicina
RT - Transcrição reversa
RT-qPCR - *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*
RXR - Retinoid X Receptor
SFB - Soro Fetal Bovino
SHP - *Small Heterodimer Partner*
SINOVA - Secretaria de Inovação
SLC - *Solute Carrier*
SSC - *Side Scatter*
SUS - Sistema Único de Saúde
Ta - Temperatura de anelamento
TAC - Terapias alternativas e complementares
TCA - Ácido tricloroacético
TEER - Resistência elétrica transepitelial
TFA - Ácido trifluoacético
Tm - Temperatura de *melting*
TQ - *Triple Quadrupole Mass Spectrometry*
U - Unidade
URF - Unidades Relativas de Fluorescência
UV - Ultravioleta
VDR - *Vitamin D Receptor*
VER - Verapamil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1. OBJETIVO GERAL.....	33
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
CAPÍTULO I.....	35
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	37
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
2.1 O uso da fitoterapia	37
2.2 Interações entre plantas medicinais e fármacos	42
2.3 Mecanismos farmacocinéticos das interações - Alterações na absorção dos fármacos	45
2.3.1 Transportadores SLC (Solute Carrier).....	49
2.3.1.1 Transportadores de cátions orgânicos (OCT)	49
2.3.1.2 Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP)	53
2.3.2 Transportadores ABC (ATP-binding cassette)	56
2.3.2.1 Glicoproteína P (P-gp)	56
2.3.2.2 Proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) .	60
2.4 Mecanismos farmacocinéticos das interações - Alterações no metabolismo por modulação de enzimas do citocromo P450	63
2.4.1 Enzima CYP3A4	65
2.4.2 Enzima CYP2D6	67
2.5 Plantas medicinais selecionadas para os estudos de interação.....	68
REFERÊNCIAS.....	75
CAPÍTULO II	101
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	103
2. MATERIAIS E MÉTODOS	103
2.1 Extratos e fármacos	103
2.2 Preparação dos extratos e fármacos para as análises cromatográficas e testes de citotoxicidade em células Caco-2	105

2.3 Perfis cromatográficos dos extratos obtidos por CLAE-UV	105
2.4 Cultura de células Caco-2	106
2.5 Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2	106
2.6 Análise estatística	107
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
3.1 Perfil exploratório dos extratos	107
3.2 Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2	122
3.2.1 Citotoxicidade dos extratos frente as células Caco-2	122
3.2.2 Citotoxicidade dos fármacos frente às células Caco-2	130
4. CONCLUSÃO	132
REFERÊNCIAS	132

CAPÍTULO III	139
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	141
2. MATERIAIS E MÉTODOS	141
2.1 Materiais	141
2.2 Cultura de células Caco-2	142
2.3 Preparação dos insertos	142
2.4 Controle de qualidade das células Caco-2	143
2.4.1 Medida da resistência elétrica transepitelial (TEER)	143
2.4.2 Permeabilidade do marcador <i>Lucifer Yellow</i>	143
2.4.3 Marcação dos filamentos de F-actina com o corante rodamina-faloidina e análise da formação das junções oclusivas por imunofluorescência	145
2.5 Preparação das amostras para as análises de transporte bidirecional	145
2.6 Ensaios de transporte bidirecional utilizando o modelo <i>Transwell</i> e células Caco-2	146
2.7 Desenvolvimento e validação de método por CLUE-EM/EM	149
2.7.1 Preparação das amostras	149
2.7.2 Equipamentos	149
2.7.3 Condições cromatográficas	150
2.7.4 Condições espectrométricas (EM/EM)	150
2.7.5 Validação do método analítico	151

2.8 Análise estatística	153
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	153
3.1 Controle de qualidade das células Caco-2	153
3.1.1 Medidas da TEER	153
3.1.2 Permeabilidade do <i>Lucifer Yellow</i>	155
3.1.3 Permeabilidade do propranolol	155
3.1.4 Diferenciação das células Caco-2	156
3.2 Escolha dos fármacos marcadores e desenvolvimento do método de preparação das amostras	158
3.3 Estabelecimento do método analítico por CLUE-EM/EM para detecção e quantificação simultânea dos fármacos quinidina, sulfassalazina e propranolol.....	162
3.4 Validação do método analítico por CLUE-EM/EM para detecção e quantificação simultânea dos fármacos quinidina, sulfassalazina e propranolol.....	166
3.5 Interações entre plantas medicinais e fármacos avaliados no modelo <i>Transwell</i> com células Caco-2	175
3.5.1 Modulação do transporte bidirecional do fármaco quinidina pelos extratos das plantas medicinais em estudo .	176
3.5.2 Modulação do transporte bidirecional do fármaco sulfassalazina pelos extratos das plantas medicinais em estudo	180
4. CONCLUSÃO	186
REFERÊNCIAS	187
CAPÍTULO IV	203
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	205
2. INTRODUÇÃO	205
3. DISCUSSÃO.....	234
REFERÊNCIAS	235
CAPÍTULO V	239
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	241
2. MATERIAIS E MÉTODOS	241

2.1 Materiais	241
2.2 Cultura de células Caco-2.....	241
2.3 Desenho dos iniciadores.....	242
2.4 Vetor	243
2.5 Extração e amplificação do DNA	243
2.6 Digestão dos produtos de PCR (CYP3A4 e CYP2D6) e do vetor pZsGreen1-1	244
2.7 Ligação produtos-vetor	245
2.8 Transformação e criopreservação bacteriana	245
2.9 Transfecção das células Caco-2 e criopreservação.....	246
2.10 Análises da modulação dos sistemas repórteres	247
2.11 Análise estatística	249
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	249
3.1 Desenvolvimento dos sistemas repórteres.....	249
3.2 Análise da funcionalidade dos sistemas CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1 por citometria de fluxo	253
3.3 Indução dos sistemas CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1 pelo fármaco rifampicina.....	258
3.4 Análise da modulação dos sistemas repórteres em células não diferenciadas pelos extratos de plantas medicinais	261
3.5 Análise da modulação dos sistemas repórteres em células diferenciadas pelos extratos das plantas medicinais	264
3.5.1 Sistema repórter CYP3A4 ZsGreen1-1	264
3.5.2 Sistema repórter CYP2D6 ZsGreen1-1.....	268
3.6 Comparação do efeito dos extratos na expressão gênica das enzimas metabólicas utilizando os sistemas repórteres com células não diferenciadas e diferenciadas.....	270
4. CONCLUSÃO.....	273
REFERÊNCIAS.....	274

CAPÍTULO VI	283
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	285
2. MATERIAIS E MÉTODOS	285
2.1 Materiais.....	285
2.2 Ensaio de modulação da expressão gênica e proteica	285

2.3 Desenho dos iniciadores e sondas de hidrólise para as análises de expressão gênica.....	286
2.4 Extração do material genético.....	288
2.5 Otimização das reações por PCR convencional	288
2.6 RT-qPCR	289
2.7 Marcação das células Caco-2 com os anticorpos anti-P-gp e anti-BCRP	290
2.8 Análise estatística	291
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	292
3.1 Amplificação dos produtos de interesse	292
3.2 Eficiência de amplificação das reações de RT-qPCR	293
3.3 Modulação da expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 e dos transportadores P-gp e BCRP em células Caco-2 pelos extratos das plantas medicinais em estudo	295
3.4 Expressão proteica dos transportadores P-gp e BCRP	303
3.4.1 Modulação da expressão proteica da P-gp	306
3.4.2 Modulação da expressão proteica da BCRP	308
3.5 Relação entre a expressão gênica e proteica dos transportadores P-gp e BCRP	310
4. CONCLUSÃO	316
REFERÊNCIAS	317
CONCLUSÃO GERAL	327

1. INTRODUÇÃO

Os únicos recursos terapêuticos disponíveis até a metade do século XIX provinham de produtos derivados da natureza e de práticas tradicionais culturalmente estabelecida entre os diferentes povos em todo o mundo. O primeiro registro histórico do uso de produtos naturais com fins medicamentosos data de 1500 a.C. e é conhecido como Papiro de Ebers. Esse registro apresenta centenas de tratamentos à base de produtos naturais de origem vegetal, animal e mineral. Independentemente do uso milenar dos produtos naturais, com o surgimento dos medicamentos obtidos sinteticamente no século XIX, eles foram sendo substituídos ou seu uso foi complementado por fármacos da medicina convencional (BRAGA; RATES; SIMÕES, 2017; JONES, 2011). Entretanto, mesmo com o advento da química orgânica de síntese, os produtos de origem natural continuaram sustentando a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos, como fonte de moléculas ou como protótipos para a síntese de estruturas químicas complexas, e permaneceram sendo essenciais em sistemas da medicina tradicional que continuaram em uso (BRAGA et al., 2017; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Atualmente, as práticas e cuidados direcionados a saúde que não fazem parte da medicina convencional são conhecidas como Terapias Alternativas e Complementares (TAC), das quais faz parte a fitoterapia. A fitoterapia, por sua vez, consiste na utilização de plantas medicinais *in natura* ou de preparações obtidas a partir delas para fins medicamentosos (JONES, 2011; NIH, 2016).

Nas últimas décadas, o uso das TAC ressurgiu como alternativa terapêutica e cresceu mundialmente, tornando inevitável os questionamentos, em especial, sobre a eficácia e a segurança desses recursos. Apesar das TAC terem origem em práticas bem estabelecidas da medicina tradicional, o que poderia indicar segurança no seu uso, elas estão sendo aplicadas em uma realidade diferente daquela vivida pelos antepassados. Atualmente, a disponibilidade de medicamentos da medicina convencional e a falta de informações sobre as possíveis interações entre plantas medicinais e fármacos, por exemplo, dificultam a garantia de ausência de efeitos nocivos, resultantes do uso combinado dessas estratégias medicamentosas (EKOR, 2014; GHOSH et al., 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2013 um plano estratégico denominado “*WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*”, no qual um dos principais tópicos abordados é a necessidade de se expandir o conhecimento e de gerar padrões regulatórios para o adequado uso das TAC. O objetivo da OMS é expandir e incentivar a aplicação da medicina tradicional para promover o bem-estar e a saúde pública, porém com garantia da sua qualidade, segurança e eficácia (WHO, 2013).

O Brasil, seguindo a tendência mundial de valorização da medicina tradicional, vem apoiando, por meio de políticas públicas, a ampliação e implantação do uso de plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos nos serviços de saúde, além de estimular os estudos sobre qualidade, segurança e eficácia dos mesmos (BRASIL, 2006; 2012). Consequentemente, nada mais adequado e esperado do que o meio acadêmico se dispôr a auxiliar nas propostas das políticas públicas, que visam facilitar o acesso a medicamentos eficazes e seguros, independente da sua origem, melhorando as condições de saúde da sociedade.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a ocorrência *in vitro* de interações entre plantas medicinais e fármacos, tanto por modificações das funções como da expressão de transportadores e enzimas metabólicas envolvidas na biotransformação de fármacos. Dez plantas medicinais foram escolhidas para este estudo (*Cynara scolymus*; *Matricaria recutita*; *Camellia sinensis*; *Cecropia glaziovii*; *Echinacea* sp.; *Cimicifuga racemosa*; *Ilex paraguariensis*; *Ginkgo biloba*; *Bauhinia forficata* e *Glycine max*), especialmente por ser sugerido na literatura o envolvimento dessas plantas e seus derivados em interações com fármacos (WILLIAMSON; DRIVER; BAXTER, 2012; WILLIAMSON; DRIVER; BAXTER, 2009). Além disso, foram priorizadas plantas utilizadas para o tratamento de doenças crônicas e preferidas as que estão listadas na RENISUS (BRASIL, 2009b).

Para atender ao objetivo geral desta Tese, as interações envolvendo o transporte bidirecional de fármacos foi avaliada *in vitro* utilizando o modelo *Transwell* contendo células Caco-2, e pela modulação da atividade enzimática da CYP2D6 recombinante. A análise da modulação da expressão gênica e proteica dos transportadores, P-gp e BCRP, e das enzimas metabólicas, CYP3A4 e CYP2D6, pelos extratos foi executada com abordagens moleculares distintas para os diferentes alvos

propostos. A investigação da modulação da expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 foi efetuada com dois sistemas celulares repórteres, desenvolvidos especificamente para esse estudo, e pela quantificação relativa de seus RNAm por RT-qPCR. A modulação da expressão dos genes *ABCB1* e *ABCG2* também foi avaliada por RT-qPCR, tendo sido adicionalmente estudada a modulação da expressão proteica dos transportadores P-gp e BCRP por marcação das células Caco-2 com anticorpos específicos seguida de análise por citometria de fluxo.

O assunto abordado nesta Tese é bastante desafiador, pois as interações entre plantas medicinais e fármacos envolvem um complexo emaranhado de vias bioquímicas e mecanismos moleculares; uma diversidade imensurável de compostos químicos e seus efeitos biológicos combinados; características inerentes à cada animal ou indivíduo, quando avaliadas *in vivo* ou clinicamente, entre tantas outras variáveis, que fazem de cada interação um universo particular (GHOSH et al., 2018). Contudo, devido à carência de informações sobre o assunto, todas as pesquisas que contribuam para um melhor entendimento das interações entre plantas medicinais e fármacos são de grande valia. A riqueza etnocultural e da biodiversidade brasileira, o interesse governamental, e as necessidades de saúde da população fornecem à essas pesquisas uma imensa e inexplorada área de trabalho, que pode trazer desenvolvimento social, técnico-científico e industrial para o país (BRASIL, 2009a; 2014).

Assim, espera-se com esse trabalho gerar informações acerca das interações entre plantas medicinais e fármacos; somar dados à literatura disponível, para que estes futuramente auxiliem no planejamento terapêutico seguro e eficaz pelos profissionais da saúde; e principalmente alertar a comunidade científica e a população em geral sobre os riscos do uso irracional de plantas medicinais sem supervisão especializada.

Esta Tese foi dividida em seis capítulos: o **Capítulo I** apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto em questão; o **Capítulo II** traz os resultados de uma caracterização química preliminar dos extratos e de sua citotoxicidade em células Caco-2; o **Capítulo III** descreve a validação de um método analítico por CLUE-EM/EM para a quantificação de fármacos marcadores utilizados em estudos farmacocinéticos, e discute os efeitos dos extratos no transporte bidirecional de fármacos; o **Capítulo IV** mostra os efeitos moduladores *in vitro* dos extratos sobre a

atividade da enzima humana recombinante CYP2D6; o **Capítulo V** descreve o desenvolvimento de dois sistemas celulares repórteres com células Caco-2, para estudos de expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6, e os efeitos dos extrato sobre esses sistemas; e, por fim, o **Capítulo VI**, que relata a atividade dos extratos na expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 e na expressão gênica e proteica dos transportadores P-gp e BCRP.

1. OBJETIVO GERAL

Investigar as potenciais interações entre plantas medicinais e fármacos sobre o transporte bidirecional, a expressão e função de transportadores e enzimas intestinais.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e caracterizar quimicamente por CLAE-UV extratos de plantas medicinais e determinar sua citotoxicidade frente a células Caco-2;
- Validar um método analítico por CLUE-EM/EM para quantificação dos fármacos marcadores utilizados em ensaios farmacocinéticos;
- Conduzir estudos de permeabilidade *in vitro* utilizando o modelo *Transwell* com células Caco-2 para determinar a atividade dos extratos no transporte bidirecional de fármacos;
- Determinar os efeitos dos extratos na atividade da enzima CYP2D6 recombinante, e caracterizar os fitoconstituintes dos extratos ativos por CLUE-EM/EM;
- Desenvolver dois sistemas repórteres utilizando células Caco-2 para investigar a atuação dos extratos na expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6;
- Avaliar a atividade dos extratos na expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 e na expressão gênica e proteica dos transportadores P-gp e BCRP.

CAPÍTULO I

**INTERAÇÕES ENTRE PLANTAS MEDICINAIS E FÁRMACOS:
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste Capítulo é apresentada a revisão bibliográfica sobre o tema desta Tese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O uso da fitoterapia

As TAC englobam o conjunto de cuidados, práticas e produtos direcionados à saúde, que não fazem parte da medicina convencional. Entre as TAC estão acupuntura, massagem, meditação, pilates, ioga, uso de suplementos, tais como vitaminas e minerais, e fitoterapia, que é o emprego de plantas medicinais e/ou medicamentos fitoterápicos com fins medicamentosos (NIH, 2016).

A procura pelas TAC vem crescendo em todo o mundo (GHOSH et al., 2018; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008). Atualmente, seus adeptos encontram-se em torno de 40-65%, em algumas populações estudadas (KEMPPAINEN et al., 2018; POSADZKI et al., 2013; THOMSON et al., 2012). Contudo, podem alcançar mais de 80% entre pacientes com doenças crônicas e graves (GOTTA; MAYER; HUEBNER, 2018; ZACHARIAE, 2016). Levantamentos demonstraram que 54 a 87% dos pacientes portadores de neoplasias (AYDIN AVCI; KOC; SAGLAM, 2012; FIRKINS et al., 2018; ZACHARIAE, 2016), 55 a 95% dos pacientes com artrite (YANG; SIBBRITT; ADAMS, 2016), 46 a 53% dos pacientes HIV+ ou com AIDS (ABOU-RIZK; ALAMEDDINE; NAJA, 2016; KELSO-CHICHETTO et al., 2016) e 82% dos pacientes com esclerose múltipla (GOTTA et al., 2018), por exemplo, recorrem às TAC.

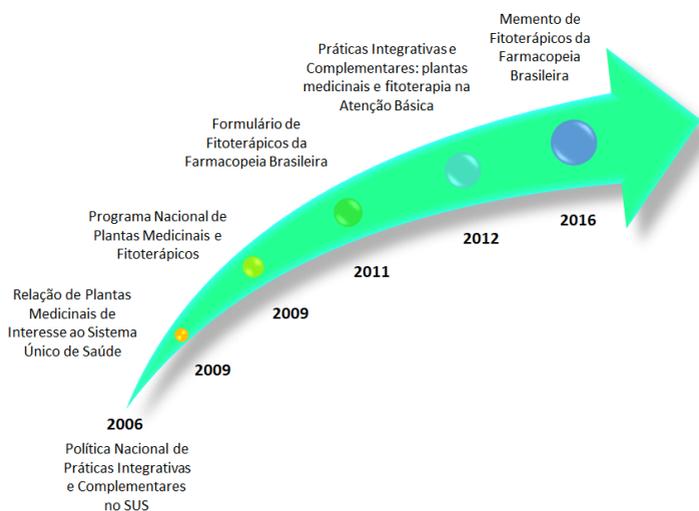
Diversos são os motivos pelos quais os usuários procuram as TAC. Alguns o fazem em busca de opções que consideram mais eficazes e menos nocivas dos que as oferecidas pela medicina convencional, para melhorar a saúde, amenizar efeitos de outras medicações, utilizar tratamentos menos onerosos e de fácil acesso, e para tratar doenças para as quais os fármacos disponíveis não foram efetivos na cura ou na melhora da qualidade de vida (FIRKINS et al., 2018; FRANÇA et al., 2008; WELZ; EMBERGER-KLEIN; MENRAD, 2018).

Alguns estudos mostraram que os produtos de origem natural, incluindo aqueles elaborados com plantas medicinais, correspondem à maior parcela das TAC utilizadas (ABOU-RIZK et al., 2016; EARDLEY et al., 2012; NIH, 2016). O uso desses produtos para fins terapêuticos tem raízes em práticas milenares, tão antigas quanto as civilizações. Nas Américas, registros arqueológicos demonstraram que o emprego de algumas espécies de plantas como remédio datam de mais de dez mil anos, e até o início do século XIX, preparações caseiras e farmacêuticas, oriundas de plantas, foram a base da farmacoterapia (BRAGA et al., 2017). Entretanto, a utilização desses produtos perdeu força entre muitos grupos populacionais devido à introdução dos medicamentos convencionais obtidos por síntese química no século XIX, ressurgindo mais fortemente a partir da metade do século XX e com muita força no século atual. Contudo, alguns sistemas medicinais tradicionais, como os das medicinas chinesa e indiana, que se desenvolveram ainda no período de florescimento dessas civilizações, permaneceram em uso mesmo com a chegada dos medicamentos obtidos por síntese química (BRASIL, 2012; JONES, 2018).

No Brasil, a fitoterapia é favorecida e viabilizada pela diversidade vegetal do país, pois o seu território possui 20% do número total de espécies vegetais do planeta, sendo considerada a maior biodiversidade do mundo. As plantas brasileiras são relativamente bem estudadas, já tendo sido registradas mais de 34.000 espécies (STEHMANN; SOBRAL, 2017). Devido às suas proporções continentais, somando mais de 8,5 milhões de quilômetros quadrados, as diferentes zonas climáticas e a variedade de biomas que recobrem suas terras, a flora brasileira destaca-se por sua heterogeneidade, possuindo um patrimônio grandioso de espécies. Além das espécies brasileiras nativas, a possibilidade de cultivo de plantas exóticas enriquece ainda mais a multiplicidade botânica disponível no território nacional (BRASIL, 2014). A biodiversidade e a variedade étnica e cultural brasileira, essa última, fruto dos inúmeros povos indígenas aqui residentes e da imigração, principalmente, europeia e africana, proporcionam ao país um acervo consistente de conhecimentos tradicionais. Esses conhecimentos contemplam saberes tanto acerca dos recursos vegetais naturais como do cultivo, preparo e utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos (BARBIERI et al., 2014; BRASIL, 2014).

A valorização da medicina tradicional pelos órgãos de saúde brasileiros também contribuiu para o crescimento da utilização de plantas medicinais *in natura* ou como matéria-prima para a elaboração de medicamentos fitoterápicos. Prova disso são as políticas públicas adotadas nas últimas duas décadas, as quais permitiram a ampliação e implantação do uso de plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos nos serviços de saúde, além de estimular o estudo sobre qualidade, segurança e eficácia dos mesmos (Figura I. 1) (DUTRA et al., 2016).

Figura I. 1 - Cronologia das ações públicas para o incentivo e a valorização do uso das TAC no Brasil.



Fonte: A autora.

Como exemplo, pode-se citar a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, criada com o intuito de introduzir e fortalecer o uso destas terapias no sistema de saúde pública brasileiro (BRASIL, 2006); a elaboração da RENISUS (Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde), composta por 71 plantas (BRASIL, 2009b); do estabelecimento do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que propõe diretrizes de regulamentação para produção, pesquisa, desenvolvimento e comercialização de fitoterápicos (BRASIL, 2009a); da elaboração do Formulário de

Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011); da normatização das Práticas Integrativas e Complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica (BRASIL, 2012); e da publicação do Memento de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2016)

Apesar da implementação das políticas públicas brasileiras, dos esforços das agências de saúde do mundo todo e da OMS para fortalecer a utilização da medicina tradicional e das TAC, a garantia da qualidade, segurança e eficácia do uso da fitoterapia são fatores que preocupam as agências reguladoras (NIH, 2016; WHO, 2013). Sobre a segurança, por exemplo, ainda é um desafio para os profissionais da saúde tomar decisões sobre o uso seguro da fitoterapia em combinação com medicamentos da medicina convencional. A escassez de evidências clínicas, o despreparo dos profissionais da saúde nesse sentido, o desconhecimento das possíveis interações, bem como das consequências do uso da fitoterapia para os pacientes, não permitem a adequada orientação aos usuários (HALL et al., 2018; UNG; HARNETT; HU, 2018; ZHANG et al., 2017).

Mesmo que os profissionais da área da saúde estivessem capacitados para fornecer suporte para o uso seguro da fitoterapia, frequentemente o mesmo ocorre por sugestão de familiares, de pessoas sem qualificação e, até mesmo, pela Internet. Ainda, é bastante comum que plantas medicinais e/ou medicamentos fitoterápicos sejam usados concomitantemente com medicamentos convencionais sem consulta ou relato aos profissionais de saúde (FRANÇA et al., 2008; LATTE-NAOR et al., 2018; WELZ et al., 2018). Pesquisas demonstraram que mais de 50% dos usuários das TAC fazem seu uso por sugestão familiar ou de amigos e apenas 4,3% por recomendação médica (CHANG et al., 2011), e entre 63,4 a 80,9% deles fazem utilização das TAC sem anteriormente comunicarem a seus médicos (KOC; CINARLI, 2018; THOMSON et al., 2012). Mais especificamente, sobre o uso da fitoterapia, em uma Dissertação realizada no Programa de Pós-graduação em Farmácia, supervisionada pela mesma orientadora desta Tese, Vieira (2008) relatou que 54% dos pacientes em tratamento quimioterápico convencional no centro oncológico CEPON, em Florianópolis, SC, utilizavam paralelamente produtos de origem vegetal, sendo que 76,4% deles não informaram seus médicos sobre a utilização desses produtos.

A despreocupação dos usuários com os possíveis efeitos nocivos do uso irracional da fitoterapia advém da crença popular de que os produtos naturais não oferecem qualquer risco à saúde (OGA et al., 2016; OWENS; BAERGEN; PUCKETT, 2014). Além disso, a facilidade de acesso às plantas medicinais faz com que a população corriqueiramente recorra à natureza, faça o cultivo caseiro de plantas ou ainda adquira preparações em feiras livres para fins medicamentosos, sem considerar os possíveis efeitos prejudiciais dessas práticas à saúde (BALBINO; DIAS, 2010; OWENS et al., 2014).

Atualmente, a simplificada aquisição de produtos naturais via Internet reforça a falsa impressão de que esses produtos não são nocivos, além de facilitar a omissão dos riscos do consumo por parte dos anunciantes/vendedores. Em uma pesquisa que consultou mais de mil páginas eletrônicas sobre produtos naturais, menos de 10% continham dados sobre segurança e possíveis interações (OWENS et al., 2014). Muitos desses produtos não são registrados, possuem composição adulterada ou contém concentrações dos seus constituintes em discordância com o descrito nas páginas eletrônicas (BLACKSELL; BYARD; MUSGRAVE, 2014). Esses dados permitem estimar os sérios riscos aos quais estão submetidos os consumidores devido à desinformação e à falta de regulamentação e fiscalização sobre a venda de fitoterápicos via Internet.

As dificuldades de regulamentação da produção e venda dos derivados de plantas medicinais é uma barreira limitante para a manutenção da qualidade e segurança desses produtos. Até mesmo a adequada classificação dos derivados vegetais como medicamentos, suplementos ou alimentos para encaixe nos sistemas regulatórios atuais, ainda é uma questão divergente entre os países, sendo inclusive sugerida a criação de uma nova classe de produtos os “fitocêuticos” ou “herbacêuticos” para a resolução dos empasses regulatórios (ABDEL-TAWAB, 2018; EKOR, 2014).

Todos esses fatores, agregados à falta de evidências científicas e ao uso disseminado da fitoterapia, aumentam os riscos das interações. Assim, as interações podem estar desapercivelmente comprometendo a eficiência dos tratamentos farmacológicos e, até mesmo, causando o óbito de pacientes. Sabe-se, no entanto, que as interações, além de prejudicarem o efeito terapêutico dos fármacos e causarem efeitos

tóxicos, geram custos adicionais aos serviços de saúde, aumentam o tempo de hospitalização e os riscos aos pacientes, diminuindo sua qualidade de vida (AWORTWE et al., 2018; ZHANG et al., 2015).

Por esses motivos, e inspirado por ações da OMS nesta área, em 2016, o *National Center for Complementary and Integrative Health* (NCCIH), dos EUA, lançou um plano estratégico com a finalidade de fortalecer o conhecimento baseado em evidências sobre o uso das TAC. O objetivo deste plano é informar e dar sustentação à tomada de decisões dos profissionais da saúde, dos formuladores de políticas públicas de saúde e da população sobre o uso das TAC (NIH, 2016). Esse plano é uma das estratégias para atender ao chamado da OMS, que considera o cumprimento dos quesitos de qualidade, eficácia e segurança como o desafio mais importante para o consumo racional dos medicamentos tradicionais.

No Brasil, o interesse não se limita apenas às esferas governamentais, como descrito. As pesquisas brasileiras, principalmente com plantas medicinais nativas, tem crescido exponencialmente nas últimas décadas. Entretanto, a produção científica e até mesmo a participação do Brasil no mercado dos fitoterápicos está muito aquém do esperado se considerarmos a biodiversidade do país (DUTRA et al., 2016).

Portanto, para ampliar o acesso às plantas medicinais de forma a apoiar a promoção da saúde, a redução dos custos e a disponibilidade de alternativas preventivas e curativas de qualidade, um dos aspectos mais relevantes a ser investigado é a segurança, e no âmbito desse tema a potencial ocorrência de interações entre plantas medicinais e fármacos (BALBINO; DIAS, 2010; WILLIAMSON et al., 2012).

2.2 Interações entre plantas medicinais e fármacos

As plantas constituem uma fonte renovável de biomoléculas com imensa variabilidade química, resultante principalmente da necessidade de sua adaptação às situações de estresse promovidas pelo ambiente (FRANÇA, 2017). São essas biomoléculas derivadas do metabolismo vegetal primário e secundário que podem prejudicar a atividade e promover reações indesejadas, tais como toxicidade e diminuição dos efeitos

terapêuticos dos fármacos (AWORTWE et al., 2018; BRANTLEY et al., 2014).

Ao contrário das interações fármacos-fármacos (BAXTER, 2010), as interações plantas medicinais-fármacos são menos conhecidas e descritas na literatura científica, sendo que a maioria dos estudos foi realizada com um restrito grupo de plantas, muitas delas de origem oriental (CHAN et al., 2010; SHI; LIN; YAO, 2018). O registro mais completo e conhecido sobre esse tema, denominado “*Stockley’s Herbal Medicines Interactions*”, já foi traduzido para a língua portuguesa; porém, diversas plantas medicinais tradicionalmente utilizadas no nosso país não são encontradas nesta obra, por falta de referências (WILLIAMSON et al., 2012).

Como citado, embora alguns trabalhos ressaltem a relevância das interações e de fatores que comprometem a segurança do uso da medicina tradicional, na prática a associação entre o uso da fitoterapia e a ocorrência de efeitos adversos, por exemplo, é discreta. Segundo pesquisa realizada entre 1999 e 2009 sobre eventos adversos notificados ao sistema de farmacovigilância da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), menos de 1% das notificações correspondiam às plantas medicinais/medicamentos fitoterápicos. Esse baixo número de relatos pode ser decorrente da dificuldade de identificação dos efeitos adversos, tanto pelos usuários como pelos profissionais da saúde (BALBINO; DIAS, 2010). De tal modo, se há dificuldades para detectar efeitos diretos do uso da fitoterapia, é provável que interações sejam menos perceptíveis ainda (LEVY et al., 2017). Afinal, as interações podem englobar uma ampla gama de sinais, sintomas e resultados terapêuticos, que possivelmente se diversificam pelas variadas combinações entre fitoterapia e medicamentos convencionais. Outro fator que justificaria a baixa notificação é que parte delas é efetuada por profissionais da saúde e muitos dos pacientes não os informam sobre o uso de plantas medicinais e seus derivados, como já citado anteriormente (KOC; CINARLI, 2018; THOMSON et al., 2012).

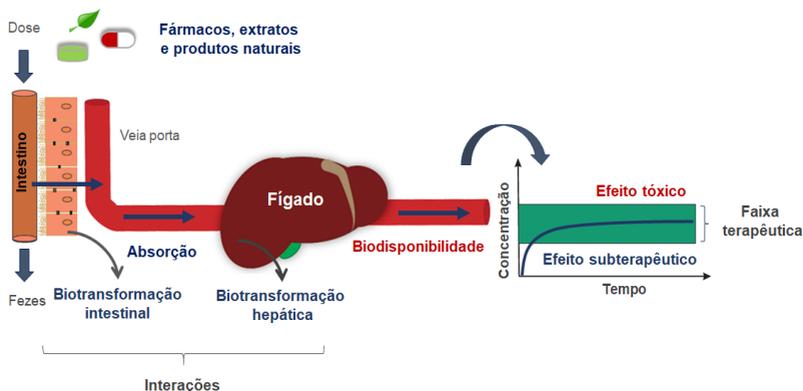
Pacientes com doenças crônicas apresentam maior risco de sofrer as consequências das interações e, nesse grupo, a identificação das mesmas é ainda mais complexa, pois comumente esses indivíduos utilizam um grande número de medicamentos, fazem uso prolongado de medicações e, como já descrito, recorrem mais do que a população em geral aos produtos

de origem natural (GOTTA et al., 2018; SILVEIRA et al., 2008; ZACHARIAE, 2016). Pacientes em tratamento com fármacos imunomoduladores, antivirais, antineoplásicos, anti-hipertensivos e hipolipidemiantes devem receber atenção especial quando se trata de interações, estando disponível na literatura algumas poucas revisões e trabalhos, que enfatizam a importância do cuidado para com esses pacientes em específico (ARSLAN; TURAL; AKAR, 2013; AWORTWE et al., 2018; COHEN; ERNST, 2010; POSADZKI; WATSON; ERNST, 2013). Devido às condições mais frágeis de saúde, uma interação que altere a ação farmacológica dos medicamentos administrados a esses pacientes pode ser irreversível e até mesmo fatal.

Além de serem identificadas, é indispensável que as interações entre plantas medicinais e fármacos sejam entendidas e seus mecanismos elucidados para que a prevenção dos eventos seja efetiva. Os mecanismos pelos quais essas interações acontecem são processos complexos, que podem envolver diferentes vias metabólicas e diferentes biomoléculas presentes nas plantas. A origem das interações podem ser farmacodinâmicas e farmacocinéticas (OGA et al., 2016). As interações na farmacodinâmica resultam do efeito farmacológico combinado das substâncias bioativas, por exemplo, por mecanismos antagônicos, aditivos ou sinérgicos (ALISSA, 2014; YANG et al., 2014). Contudo, corriqueiramente, as interações advêm de alterações na biodisponibilidade dos fármacos. A biodisponibilidade é influenciada por um somatório de fatores que incluem a quantidade do fármaco absorvida no intestino, a porção que resiste ao metabolismo intestinal e é transferida para o fígado, e a fração que passa intacta pelo metabolismo hepático e é transferida para a circulação sistêmica (Figura I. 2) (XIE; DING; ZHANG, 2016).

Interferências nas etapas farmacocinéticas, por modulação de transportadores de membrana e enzimas do metabolismo pré-sistêmico, que são pontos cruciais da absorção e do metabolismo, respectivamente, consistem em mecanismos básicos de muitas interações, tanto fármaco-fármaco como planta medicinal-fármaco (CHOI; CHIN; KIM, 2011; MARQUEZ; VAN BAMBEKE, 2011).

Figura I. 2 - Metabolismo pré-sistêmico e parâmetros farmacocinéticos que podem ser modulados por plantas medicinais.



Fonte: A autora.

Pesquisas sobre como os transportadores presentes no intestino e o metabolismo intestinal influenciam na biodisponibilidade dos fármacos e participam das interações são frequentemente negligenciadas e a participação intestinal subestimada neste contexto, sendo maior atenção dada à atuação hepática (MULLER et al., 2017). Embora, neste trabalho, as análises de interações, na maioria das vezes, possam ser inferidas para o que ocorre também em outros tecidos, que não o intestinal, a pesquisa tem objetivo de ressaltar a importância da permeabilidade e metabolismo intestinal nas interações planta medicinal-fármaco.

Considerando o objetivo deste trabalho, serão detalhados nesta revisão bibliográfica dois mecanismos fundamentais envolvidos nas interações tanto entre fármacos como entre fármacos e plantas medicinais, bem como os principais transportadores e enzimas a elas associados.

2.3 Mecanismos farmacocinéticos das interações - Alterações na absorção dos fármacos

A administração oral de plantas medicinais ou de fármacos, via de administração preferida pelos pacientes por sua

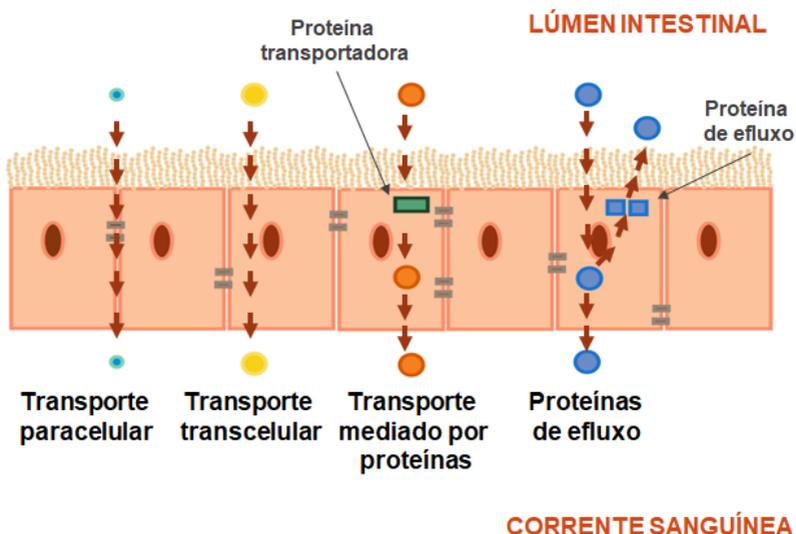
conveniência e conforto, envolve a absorção das substâncias bioativas no intestino delgado, que ocorre principalmente nas porções do duodeno e jejuno-íleo. A absorção é o processo pelo qual as moléculas passam do sítio de administração para a circulação sistêmica (TOZER; ROWLAND, 2009). No intestino é favorecida pela presença de vilosidades, que aumentam a área de superfície e melhoram o processo absorptivo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; MURAKAMI, 2017). Anatomicamente, os enterócitos estão organizados de forma polarizada e justaposta, unidos por junções oclusivas, que regulam a passagem de substâncias paracelularmente, formando uma barreira seletiva no lúmen intestinal (AWORTWE; FASINU; ROSENKRANZ, 2014; MASAOKA et al., 2006; TURNER et al., 2014). Essa barreira permite a absorção dos compostos bioativos na dependência da sua solubilidade e permeabilidade intestinal (ABUHELWA et al., 2017).

A biodisponibilidade dos compostos bioativos é influenciada por diversos fatores intrínsecos ao organismo e pelas características das moléculas (ABUHELWA et al., 2017). A solubilidade das substâncias está estreitamente associada com as suas características moleculares, tal como a capacidade de formar ligações de hidrogênio, os valores de pKa e com o ambiente fisiológico durante a dissolução. A permeabilidade, por sua vez, é dependente da concentração das substâncias no lúmen intestinal, da presença dos transportadores de membrana, da modulação dos receptores de membrana, entre outras variações fisiológicas e bioquímicas (ABUHELWA et al., 2017; MARTINEZ; AMIDON, 2002; MURAKAMI, 2017; OGA et al, 2013).

As moléculas bioativas podem chegar a corrente sanguínea por múltiplas vias, envolvendo transporte ativo e/ou passivo (Figura I. 3). O transporte passivo pode se dar paracelularmente, o que permite a passagem de moléculas hidrofílicas de baixo peso molecular, ou através da via transcelular, pela qual as moléculas lipofílicas permeiam as membranas das células. Muitos fármacos são transportados passivamente, porém alguns possuem propriedades físico-químicas que exigem um transporte facilitado. Uma das formas desse transporte é a difusão passiva facilitada, a qual utiliza transportadores que carregam substratos por gradiente de concentração sem consumir energia (KUMAR et al., 2010). Esse tipo de transporte é relativamente específico e é inibido por outros substratos do mesmo carreador. Outra maneira é o

transporte ativo, que é dependente de energia (Adenosina Trifosfato, ATP), capaz de transportar fármacos contra um gradiente de concentração, efetuando influxo ou efluxo de moléculas nas células (ESTUDANTE et al., 2013; TOZER; ROWLAND, 2009).

Figura I. 3 - Mecanismos de transporte envolvidos na absorção intestinal.



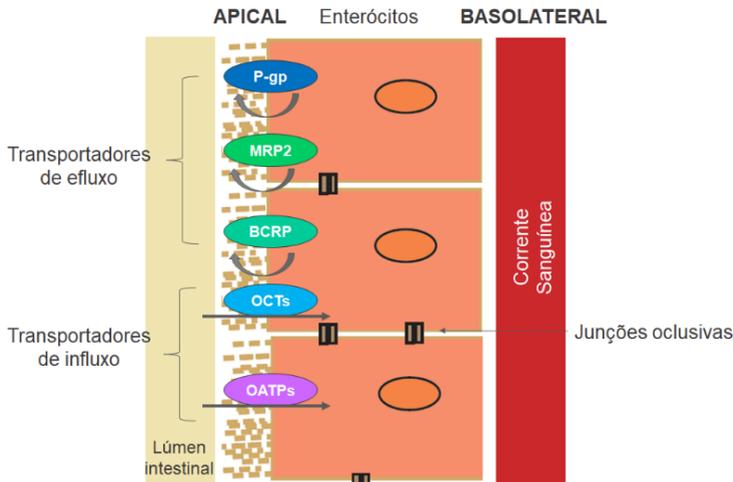
Fonte: A autora.

Por atuarem no transporte dos fármacos e de compostos ativos, terem atividade modulada por xenobióticos e afetarem diretamente a biodisponibilidade dos fármacos, tem sido destacada a importância da avaliação de transportadores em estudos farmacocinéticos e de interações durante o desenvolvimento de medicamentos (FDA, 2012; MAEDA; SUGIYAMA, 2013). O enorme interesse pelo assunto levou à formação do *International Transporter Consortium* (ITC) composto por cientistas da academia, indústria e agências reguladoras de todo o mundo, com o objetivo de solidificar a compreensão da biologia dos transportadores e desafiar o pensamento atual para melhor abordar as questões complexas e críticas relacionadas aos

transportadores no desenvolvimento de novos fármacos (ITC, 2018).

Como resultado do ITC, foi publicado em 2010 o ‘*FDA transporter white paper*’, documento redigido para fornecer orientações para o delineamento de estudos pré-clínicos e clínicos de interações medicamentosas e para auxiliar no desenvolvimento de medicamentos. Esse documento salienta os transportadores que carecem de investigação por demonstrarem relevância clínica na biodisponibilidade e na segurança do uso de diversos fármacos. Entre os transportadores citados estão os da superfamília dos SLC (*Solute Carrier*), composta pelos *Organic Anion Transporting Polypeptide* (OATP), *Organic Cation Transporters* (OCT) e os transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*), grupo ao qual pertence as proteínas P-gp (*P-glycoprotein*) e BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) (Figura I. 4) (HILLGREN et al., 2013; ITC et al., 2010).

Figura I. 4 - Transportadores atuantes na absorção intestinal de fármacos.



Legenda: P-gp - *P-glycoprotein*; MRP2 - *Multidrug resistance protein 2*; BCRP - *Breast Cancer Resistance Protein*; OCT - *Organic Cation Transporters*; OATP - *Organic Anion Transporting Polypeptide*.

Fonte: A autora.

Por sua importância nas interações fármaco-fármaco, e por também atuarem nas interações entre alimentos, suplementos, plantas medicinais e fármacos (LAI; JAY; SWEET, 2018; LI; REVALDE; PAXTON, 2017), esses transportadores serão apresentados a seguir com mais detalhes.

2.3.1 Transportadores SLC (*Solute Carrier*)

Os transportadores SLC são proteínas integrais de membrana encarregadas do transporte facilitado de substâncias endógenas e xenobióticos (ESTUDANTE et al., 2016). Esse grupo de transportadores possui mais de 400 membros classificados em 52 famílias, de acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos. Com base no número expressivo de proteínas descritas, a lista de novos integrantes dos SLC vem aumentando exponencialmente desde o início das pesquisas na área (HEDIGER, 2018; HEDIGER et al., 2013; HEDIGER et al., 2004).

Com o advento das técnicas moleculares, as pesquisas com os carreadores SLC se fortaleceram no final da década de 80 e início dos anos 90, época em que foi estabelecida a nomenclatura dos genes SLC por Matthias Hediger e colaboradores (2004). Esses pesquisadores propuseram um sistema nominal, que emprega números e letras para a identificação das famílias e subfamílias dos transportadores, respectivamente. A partir de então, o interesse por essas proteínas tem crescido, ocorrendo progressos na investigação sobre suas funções fisiológicas, associação com diversas doenças e seu potencial como alvo terapêutico (HEDIGER et al., 2013).

Os transportadores SLC contemplam carreadores de vitaminas, de glicose, de neurotransmissores e de xenobióticos. Os OATP, codificados pelos genes *SLCO*, e os OCT, codificados pelos genes *SLC22*. Esses transportadores têm papel de destaque no transporte passivo de xenobióticos, em especial os transportadores OCT1 e OATP2B1 (DROZDZIK et al., 2014; HGNC, 2018).

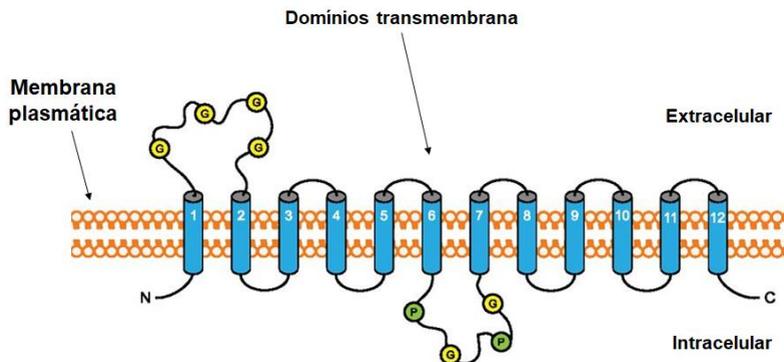
2.3.1.1 Transportadores de cátions orgânicos (OCT)

Os transportadores pertencentes ao grupo SLC22 compõem uma família com 23 membros, propostos até o momento. Os transportadores mais conhecidos e estudados desse grupo são os

transportadores OCT1, OCT2, OCT3, OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, URAT1 (LAI et al., 2018), sendo as duas maiores subfamílias as formadas pelos transportadores OCT e OAT (ZHU et al., 2015).

Esses transportadores estão distribuídos por diversos tecidos e órgãos, tais como nas barreiras hematoencefálica e cérebro-espinal, nos rins, no fígado, nos testículos e no intestino delgado (LAI et al., 2018; LI et al., 2017). Os transportadores OCT2, OAT1, OAT3 e OAT4 têm função importante na eliminação renal de compostos endógenos e xenobióticos. O transportador URAT1 também atua principalmente nos rins promovendo a reabsorção do ácido úrico. O transportador OAT2, expresso sobretudo no fígado e nos rins, transporta ânions orgânicos endógenos como prostaglandinas e também afeta a disponibilidade de fármacos como a de alguns antitumorais e antivirais. No cérebro, os transportadores OCT2 e OCT3 possuem papel importante na regulação de diversas funções, tais como controle do humor e da ansiedade (COUROUSSE; GAUTRON, 2015). O carreador OCT1 é expresso, principalmente, no fígado, mas também no intestino delgado, sendo um dos principais transportadores envolvidos em interações fármaco-fármaco. No intestino delgado, ele distribui-se homogeneamente nos diferentes segmentos, dispondo-se na região apical dos enterócitos (MULLER et al., 2017). Esse transportador faz o influxo de diversas substâncias e é crucial na absorção de vários compostos bioativos (HAN et al., 2013; LOZANO et al., 2018).

Os transportadores OCT1 murinos foram isolados de células intestinais e hepáticas de ratos em 1994 (GRUNDEMANN et al., 1994). Em 1997, os transportadores OCT2 murinos e os homólogos humanos (hOCT1 e hOCT2) foram clonados e caracterizados (GORBOULEV et al., 1997). Os transportadores OCT1, 2 e 3 são codificados pelo gene localizado no cromossomo 6q25.3 do genoma humano (ZHU et al., 2015), os transportadores OCT possuem aproximadamente 64 kDa e estruturalmente são formados por doze domínios transmembranários, um domínio N-terminal intracelular, uma alça extracelular glicosilada, uma alça intracelular com sítios de fosforilação e um domínio C-terminal intracelular (Figura I. 5) (SHU et al., 2003).

Figura I. 5 - Estrutura dos transportadores OCT.

Legenda: G - Sítios de N-glicosilação; P -Sítios de fosforilação.

Fonte: Modificado de Walsh e colaboradores (2015).

Todos os transportadores OCT atuam translocando substratos estruturalmente diversificados em ambas as direções da membrana plasmática, independentemente de sódio, cloro ou de gradiente de prótons. Eles funcionam como uniportadores eletrogênicos para cátions ou como trocadores eletroneutros de cátions (KOEPSSELL, 2015). A formação de um potencial negativo no interior da membrana facilita o influxo dos substratos permitindo um aumento na concentração intracelular do mesmo (CHIEN et al., 2016).

Os substratos desses transportadores são de baixo peso molecular, tipicamente cátions orgânicos, com uma ou duas cargas positivas, ou bases fracas positivamente carregadas em pH fisiológico (BARENDDT; WRIGHT, 2002; ROTH; OBAIDAT; HAGENBUCH, 2012). Esses transportadores carregam tanto substratos endógenos, tais como vitaminas, prostaglandinas, dopamina e serotonina, bem como xenobióticos, tais como quinidina, lamivudina, cimetidina, atenolol, entre outros (LOZANO et al., 2018; SALA-RABANAL et al., 2013).

A inibição dos OCT é verificada por diversas classes de fármacos, como os antidepressivos, antiparkinsonianos, antiarrítmicos, antibióticos e anti-inflamatórios (AHLIN et al., 2008; KOEPSSELL, 2015; LU et al., 2018). Em um estudo realizado com 191 fármacos, foram encontradas 62 moléculas (32%) inibidoras

de OCT1, entre eles verapamil, cetoconazol, amitriptilina e tamoxifeno (AHLIN et al., 2008). Outro estudo utilizando análises experimentais e computacionais, realizado com mais de 900 fármacos detectou 244 fármacos (27%) inibidores de OCT2, entre eles benztropina, buflomedil, imatinibe e olanzapina (KIDO; MATSSON; GIACOMINI, 2011).

As modificações na biodisponibilidade de fármacos envolvendo os transportadores OCT são mais estudadas por associação com os polimorfismos genéticos, tendo sido demonstrado, por exemplo, que os polimorfismos do gene codificador de OCT1 aumentam a susceptibilidade às interações fármaco-fármaco (ARIMANY-NARDI; KOESELL; PASTOR-ANGLADA, 2015; FAHRMAYR; FROMM; KONIG, 2010). Entretanto, a expressão dessa subfamília de transportadores tem regulação transcricional e pós-transcricional, tanto por modificações fisiológicas como pela modulação por xenobióticos, esta última menos investigada, apesar de serem ponto-chave nas interações (KOESELL, 2015).

O limitado número de estudos, em especial sobre interações via transportadores OCT, pode ser parcialmente justificado pela relativa recente caracterização desses transportadores, que ocorreu a partir da metade da década de 90, sendo que a maioria dos estudos até o momento objetivou entender melhor suas características básicas estruturais e de funcionamento (CESAR-RAZQUIN et al., 2015; ESTUDANTE et al., 2016; GORBOULEV et al., 1997; GRUNDEMANN et al., 1994).

Apesar das restritas informações disponíveis sobre o assunto, alguns extratos de plantas e seus metabólitos são descritos na literatura como moduladores de OCT. Como exemplos podem ser citados os alcaloides tropânicos, grupo ao qual pertencem os fármacos anticolinérgicos, utilizados para o tratamento de doenças pulmonares crônicas e da asma. Esses alcaloides estão presentes em plantas como trombeteira (*Brugmansia suaveolens*), meimendo (*Hyoscyamus niger*) e coca (*Erythroxylum coca*), os quais atuam como inibidores de OCT (CHEN et al., 2017; HERNANDES; KATO; BACCHI, 2017). Como indutor desses transportadores é relatado o extrato etanólico de hortelã-pescado (*Houttuynia cordata*), que induz o influxo da metformina via OCT em ratos (YOU et al., 2018).

Por ser um substrato de OCT, a metformina é muito utilizada como marcador para estudos de transporte. Na farmacoterapia,

esse fármaco é aplicado no tratamento da diabetes, uma doença crônica que necessita do uso contínuo de medicação, assim, esse é um dos fármacos sujeitos a interações, as quais pode ter relevância clínica (FAHRMAYR et al., 2010; YOU et al., 2018).

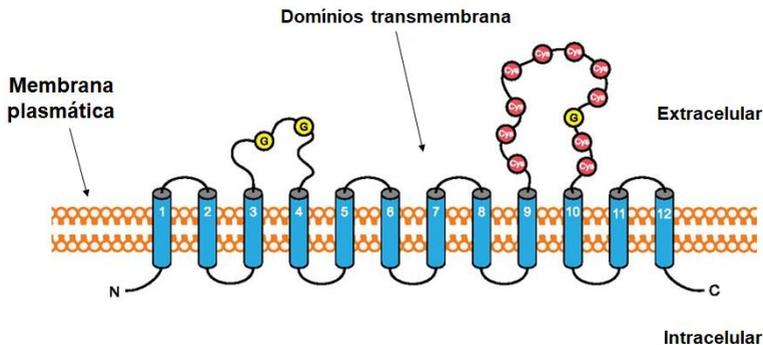
2.3.1.2 Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP)

Os transportadores OATP são membros da família SLCO, denominada anteriormente de SLC21. Esses transportadores são agrupados em seis famílias (OATP1-OATP6) e em 13 subfamílias, de acordo com a similaridade de aminoácidos (≥ 40 e 60% de similaridade, respectivamente) (HAGENBUCH; MEIER, 2004; HAGENBUCH; STIEGER, 2013; ROTH et al., 2012).

Jacquemin e colaboradores (1994) isolaram o primeiro transportador OATP, denominado OATP1A1, em ratos, que foi após clonado e expresso em oócitos de *Xenopus laevis*. Logo depois, Kullak-Ublick e colaboradores (1995) isolaram o primeiro OATP humano, denominado OATP1A2. Dos transportadores OATP humanos, quatro são codificados pelo gene localizado no cromossomo 12p12 e os demais por genes dispersos no genoma (NCBI, 2017).

Similarmente aos transportadores OCT, os OATP são estruturalmente compostos por 12 domínios transmembranários; uma alça extracelular, que contém resíduos de cisteína; uma alça extracelular, com múltiplos locais putativos de glicosilação, e domínios N- e C-terminais intracelulares compõe sua estrutura (Figura I. 6) (YAO et al., 2012).

Figura I. 6 - Estrutura dos transportadores OATP.



Legenda: G - Sítios de N-glicosilação; Cys - Resíduos de cisteína.

Fonte: Modificado de Walsh e colaboradores (2015).

Assim como os transportadores OCT, os OATP estão envolvidos no influxo de substâncias endógenas e de xenobióticos em vários tecidos. Eles possuem participação fundamental na absorção intestinal de fármacos e na biodisponibilidade dos mesmos, atuando independentemente de sódio ou ATP, porém podendo ser afetados pelo pH (HAGENBUCH; STIEGER, 2013; ROTH et al., 2012; SATLIN; AMIN; WOLKOFF, 1997; TAMAI, 2012). Em pH extracelular ácido, por exemplo, o transportador OATP2B1 aumenta tanto sua atividade como sua especificidade aos substratos. O exato mecanismo de transporte efetuado pelos OATPs ainda não é completamente elucidado; no entanto, o acoplamento de contra íons, como o bicarbonato, e o influxo dirigido por um gradiente de prótons no transporte de moléculas já foram sugeridos (SATLIN et al., 1997; VARMA et al., 2011).

A expressão dos OATPs se dá em todos os tecidos epiteliais e endoteliais, com localização na membrana plasmática, em posição particular para cada transportador, podendo ser apical ou basolateral. Alguns desses transportadores, tal como o OATP1A2, são amplamente expressos em humanos, enquanto outros são órgão-específicos, tais como os OATP1B1 e OATP1B3, expressos no fígado (ROTH et al., 2012).

Entre os OATPs conhecidos, os expressos no intestino são OATP1A2, OATP2B1, OATP3A1 e OATP4A1, denominados

anteriormente de OATP-A, OATP-B, OATP-C e OATP-D, respectivamente (HGNC, 2018; TAMAI, 2012). Neste grupo destacam-se os transportadores OATP1A2 e OATP2B1 como mediadores da absorção tanto de fármacos como de fitoconstituintes (MEIER et al., 2007; SHITARA et al., 2013). O OATP2B1 é o mais expresso no intestino delgado, tendo distribuição homogênea ao longo de suas seções e atuando como principal transportador desse grupo na absorção intestinal. Os demais componentes dessa família são expressos na barreira hematoencefálica, fígado, rins, placenta, musculatura esquelética, entre outros órgãos/tecidos (MEIER et al., 2007; SHITARA et al., 2013).

Os substratos dos OATPs são majoritariamente moléculas lipofílicas aniônicas orgânicas com mais de 350 Da, mas também podem carrear moléculas neutras e catiônicas. Transportam compostos endógenos, tais como sais biliares e hormônios, além de peptídeos aniônicos e grande variedade de xenobióticos (ROTH et al., 2012). São sugeridos mais de 100 substratos marcadores dos transportadores OATP1A2 e OATP2B1, incluindo compostos endógenos, fármacos e produtos naturais (YU et al., 2017). São exemplos de substratos de OATP2B1 os fármacos atorvastatina, benzilpenicilina, 3-sulfato de estrona, fexofenadina, glibenclamida, rifampicina, sulfassalazina e compostos de origem natural, tais como quercetina e escutelarina (ESTUDANTE et al., 2016; YU et al., 2017).

A modulação do transportador OATP2B1, tanto por fármacos como por produtos naturais, já está descrita na literatura. Os fármacos budenosida, ciclosporina, glibenclamida, quinidina e rifampicina são inibidores conhecidos de OATP2B1 (ESTUDANTE et al., 2016). Ainda, são relatados como inibidores de OATPs os sucos de maçã e uva, os quais comprovadamente reduzem a biodisponibilidade *in vivo* dos fármacos substratos dos OATPs. Alguns metabólitos secundários vegetais, tais como hisperidina, bergamotina, naringenina e quercetina, por sua vez, são potentes inibidores de OATP2B1 (YU et al., 2017).

Conforme descrito, os transportadores de influxo constituem alvos interessantes e pouco explorados para investigações sobre as interações plantas medicinais-fármacos. Contudo, apesar dos transportadores SLC serem expressos em maior quantidade no intestino delgado (DROZDZIK et al., 2014) do que os da família ABC, esses últimos são os mais estudados, e a maioria das

interações conhecidas envolvendo transportadores são a eles atribuídas.

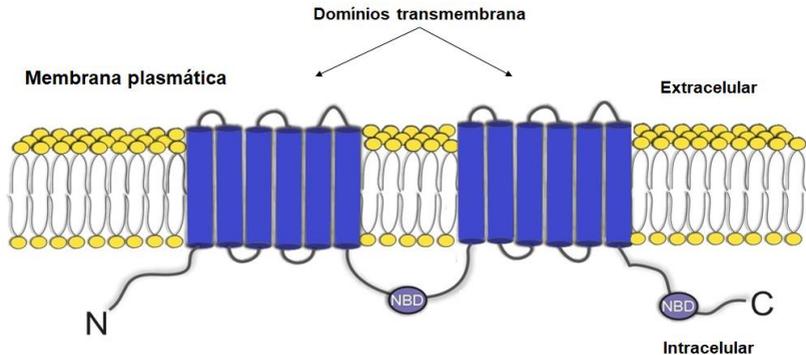
2.3.2 Transportadores ABC (ATP-binding cassette)

Os transportadores ABC (ATP-binding cassette) são classificados em subfamílias de A a G, já tendo sido identificados 51 transportadores pertencentes a esse grupo (ZAKERI-MILANI; VALIZADEH, 2014). Dois dos transportadores ABC, a glicoproteína P (P-gp/*ABCB1*) e a *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP/*ABCG2*), são os carreadores de efluxo de maior relevância para as interações. No organismo, esses transportadores são responsáveis pela redução do acúmulo de xenobióticos intracelulares, um mecanismo fisiológico em tecidos saudáveis e que tem papel na detoxificação e proteção do organismo contra substâncias nocivas (FROMM; KIM, 2011; STAUD; PAVEK, 2005).

Por serem bastante estudados e associados às interações, bem como por fazerem parte dos transportadores listados como de interesse pelo ITC, serão descritas a seguir particularidades desses dois transportadores (ITC, 2018).

2.3.2.1 Glicoproteína P (P-gp)

A P-gp é uma das proteínas transmembranárias de efluxo extensivamente estudada e de grande importância para os mecanismos de absorção de fármacos (KUMAR et al., 2010). A P-gp pertence à família de transportadores ABC, possui 1.280 aminoácidos, é codificada pelo gene *ABCB1*, conhecido também como *MDR1* (*Multi-Drug Resistance 1*), que contém 28 éxons e está localizado no cromossomo 7 humano (NCBI, 2017). Estruturalmente, é composta por duas porções contendo seis domínios transmembranários cada e dois domínios de ligação de nucleotídeos/ATP (NBD) (Figura I. 7) (SCHINKEL; JONKER, 2003).

Figura I. 7 - Estrutura da P-gp.

Legenda: NBD - Domínios de ligação de nucleotídeos.

Fonte: A autora.

Esta proteína foi isolada e descrita por Juliano e Ling (1976), em células de ovário de hamster chinês resistentes à colchicina. O fenótipo resistente à colchicina foi vinculado à redução da permeabilidade desse fármaco nas células devido à presença de uma glicoproteína de superfície celular de aproximadamente 170 KDa, que foi denominada de glicoproteína “P”, exatamente por alterar a “permeabilidade” do fármaco.

A P-gp está presente no fígado, barreira hematoencefálica, linfócitos, testículos, placenta e células tumorais, além de ocorrer nos intestinos delgado e grosso (KUMAR et al., 2010). Na maioria dos tecidos, a P-gp se encontra na região apical das membranas de células epiteliais, onde regula a extrusão dos substratos, controlada por mecanismos de fosforilação e desfosforilação proteica (CASCORBI, 2011; LI; BLUTH, 2011; UNIPROT, 2015; WOLKING et al., 2015). No intestino, a quantificação de RNAm demonstrou que a expressão de *ABCB1* é maior na porção do jejuno, diminuindo no íleo e no cólon (BERGGREN et al., 2007). Um estudo mais recente demonstrou quantidades similares de RNAm no jejuno e no íleo, porém, com aumento do conteúdo de P-gp no sentido duodeno < jejuno < íleo, e menor expressão no cólon (DROZDZIK et al., 2014).

A modulação da expressão e/ou atividade da P-gp é decisiva para a biodisponibilidade de muitos fármacos substratos dessa

proteína (na maioria hidrofóbicos, anfipáticos, catiônicos ou neutros com tamanho entre 100 e 4.000 Da), tais como bloqueadores de canais de cálcio, fármacos antirretrovirais, antibióticos, imunossuppressores e antagonistas dos receptores de histamina H₂. Porém, algumas moléculas carregadas negativamente, tais como atorvastatina e fexofenadina, ou hidrofílicas, tal como metotrexato, também são substratos desse carreador (SILVA et al., 2015; TOZER; ROWLAND, 2009; ZAKERI-MILANI; VALIZADEH, 2014).

A P-gp é modulada por moléculas bastante diversificadas do ponto de vista estrutural. A presença de anéis aromáticos e de nitrogênio básico nos moduladores parece ser importante para a afinidade entre os substratos e a proteína, porém não é determinante, visto que muitos fármacos, tal como a ciclosporina, não apresentam essas características e mesmo assim são moduladores dessa proteína (UEDA; TAGUCHI; MORISHIMA, 1997). A lista de fármacos moduladores da P-gp inclui os indutores clotrimazol, morfina, indinavir, fenotiazina, rifampicina e saquinavir (KIM, 2002), e os inibidores cetoconazol, elacridar, quinidina, reserpina, ritonavir e tracolimus (FDA, 2012), entre outros (MARQUEZ; VAN BAMBEKE, 2011).

A atividade da P-gp pode ser inibida por moléculas que competem pelo sítio de ligação com o substrato ou por inibição não competitiva ou alostérica, por bloqueio do processo de hidrólise de ATP, e por alteração na camada lipídica da membrana celular (KUMAR et al., 2010; MARCHETTI et al., 2007). Os fármacos verapamil e ciclosporina são inibidores competitivos, o *cis*-(Z)-flupentixol inibe o transportador alostericamente alterando a conformação da P-gp (MAKI; HAFKEMEYER; DEY, 2003), e o metabólito secundário vegetal 3-galato de epigalocatequina altera a atividade da ATPase (DASH et al., 2015).

A alta expressão da P-gp no intestino reduz a absorção dos seus substratos, o que diminui a biodisponibilidade dos mesmos. Por sua vez, a inibição da expressão da P-gp aumenta a absorção de fármacos substratos no intestino delgado e na barreira hematoencefálica, favorecendo o acúmulo de substratos no sistema nervoso central (HONÓRIO; MODA; ANDRICOPULO, 2013; KOSHIBA et al., 2008).

A ocorrência de interações, geralmente prejudiciais para a eficácia terapêutica, vem sendo estudada para utilização a favor da saúde dos pacientes. Como a alta expressão da P-gp e da

BCRP induz a resistência aos antineoplásicos, é de interesse caracterizar biomoléculas inibidoras dessas proteínas para associá-las à terapia antitumoral clássica e reduzir a resistência aos tratamentos já disponíveis (KHAN et al., 2015; MARCHETTI et al., 2007; STAUD; PAVEK, 2005). A inibição da P-gp também vem sendo estudada para melhorar a distribuição de fármacos que atuam no sistema nervoso central, visto que o efluxo dos substratos na barreira hematoencefálica impede a manutenção da concentração terapêutica desses fármacos no cérebro (REDDY et al., 2016).

Apesar de já ser conhecido um número expressivo de fármacos moduladores da P-gp, muitos deles, como os de primeira geração (Ex. verapamil, quinidina, ciclosporina A e tamoxifeno) e segunda geração (Ex. dexverapamil, valsopodar e PSC 833), não são atualmente aplicados na clínica por causarem efeitos adversos, tóxicos, interações com outros fármacos e/ou não serem específicos para um único transportador, sendo necessário que mais pesquisas sejam realizadas para o desenvolvimento dessa estratégia (AMIN, 2013; ZAKERI-MILANI; VALIZADEH, 2014). Nesse contexto, a investigação de produtos naturais e seus derivados com atividade inibidora de proteínas de efluxo poderia contribuir para o desenvolvimento de novas formulações mais eficazes.

Algumas plantas medicinais já são bem conhecidas por causarem interações via P-gp, tal como *Hypericum perforatum* (erva-de-são-joão ou hipérico); porém, a grande maioria é pouco explorada e investigada neste sentido (WEBER et al., 2004). Em um estudo utilizando células Caco-2, foi observada a inibição da P-gp pelo extrato de *Momordica charantia* (melão-de-são-caetano) (KONISHI et al., 2004). Em uma investigação também com células Caco-2, que avaliou 68 extratos de plantas, foram identificados nove deles como inibidores da P-gp, entre os quais estavam os extratos de morango e laranja (DEFERME; VAN GELDER; AUGUSTIJNS, 2002). Outro estudo *in vitro* com células MCF-7, derivadas de câncer de mama, demonstrou inibição da P-gp pelo extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (PLOUZEK et al., 1999). Trabalhos mais recentes *in vivo* também comprovaram a modulação da P-gp por produtos de origem natural (BAE et al., 2016; LI et al., 2014; LIANG et al., 2013). No estudo de Bae e colaboradores (2016), por exemplo, a interação teve um efeito positivo: o extrato de *Panax ginseng* (ginseng) foi administrado em

combinação com paclitaxel para o tratamento de tumor de mama em ratos, resultando na melhora da biodisponibilidade do paclitaxel e do efeito terapêutico desse fármaco por inibir a atividade e a expressão da P-gp.

Além de extratos de plantas medicinais, alguns compostos isolados ou derivados de produtos naturais já foram identificados como sendo responsáveis pela modulação da expressão/atividade da P-gp. Entre eles estão flavonoides (icaritina, baicaleína, silimarina, canferol, naringenina, quercetina), cumarinas (bergamotina e bergaptol), terpenoides, alcaloides, saponinas esteroidais (ABDALLAH et al., 2015; KHAN et al., 2015; REDDY et al., 2016) e antocianidinas (malvidina e pelargonidina) (VRZAL, 2016). Alguns destes compostos agem diretamente na expressão/atividade da P-gp e outros, como 3-galato de epigalocatequina, além de reduzirem a expressão da P-gp, alteram a atividade da ATPase, agindo também de forma indireta sobre a P-gp (DASH et al., 2015).

Estes poucos exemplos fornecem a dimensão dos inúmeros constituintes químicos de plantas medicinais, que podem ainda ser investigados. Adicionalmente, demonstram que a identificação e o detalhamento das interações entre plantas medicinais e fármacos, além de contribuírem para o uso seguro da fitoterapia ainda podem colaborar para a reformulação das terapias farmacológicas disponíveis com o objetivo de aumentar a efetividade das mesmas.

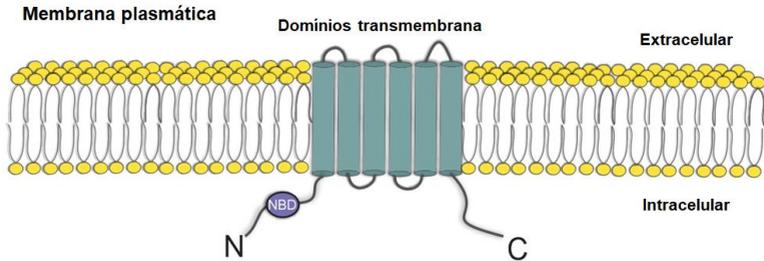
2.3.2.2 Proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP)

A BCRP é um transportador ABC de efluxo que foi descoberto em 1998. Recebeu essa denominação por ter sido identificado na linhagem celular de câncer de mama, MCF-7, na qual é superexpresso (DOYLE et al., 1998). Essa proteína também ficou conhecida como MXR, por ter sido identificada na linhagem celular de carcinoma de colón, S1-M1-80, resistente à mitoxantrona, e como ABCP, pois é altamente expressa na placenta humana (MAO; UNADKAT, 2005).

A BCRP é codificada pelo gene *ABCG2*, composto por 16 éxons, localizado no cromossomo 4 humano, possui 72 kDa e é composta por 655 aminoácidos. Estruturalmente, essa proteínas é constituída por uma única porção com seis domínios transmembranários e um domínio de ligação de nucleotídeos/ATP

(NBD) (Figura I. 8) (NCBI, 2017; SCHINKEL; JONKER, 2003; STAUD; PAVEK, 2005).

Figura I. 8 - Estrutura da BCRP.



Legenda: NBD - Domínios de ligação de nucleotídeos.

Fonte: A autora.

A BCRP é encontrada no fígado, cérebro, rins, intestino delgado, tumores, células não diferenciadas, entre outros (MAO; UNADKAT, 2005). No intestino delgado, a maior expressão se dá nas porções do jejuno e íleo (DROZDZIK et al., 2014).

A BCRP reconhece moléculas com características químicas variadas, tanto moléculas com cargas negativas quanto positivas, ânions orgânicos, e moléculas conjugadas com sulfato (STAUD; PAVEK, 2005). Em relação à estrutura do transportador, os aminoácidos na posição 482, 446 e 557 parecem ser decisivos para o reconhecimento dos substratos pela BCRP. Mutações nessas regiões conferem desde redução da resistência aos substratos até a perda total da resistência em alguns tipos celulares (MAO; UNADKAT, 2005)

Fármacos antitumorais, tais como topotecano, irinotecano, mitoxantrona, metotrexato e doxorubicina; fármacos inibidores da tirosina quinase, tais como imatinibe e gefitinibe; além das estatinas, nitrofurantoínas, lamivudina e ciprofloxacino, são substratos da BCRP (ESTUDANTE et al., 2013; MAO; UNADKAT, 2005). Como pode ser observado, a BCRP possui uma série de substratos com atividade antitumoral. Da mesma forma que para a P-gp, a investigação de inibidores desta proteína também pode auxiliar na terapia antineoplásica. Atualmente, por meio de

modificações estruturais, os pesquisadores vêm tentando identificar moléculas que sejam potentes inibidores da BCRP e estabelecer relações estrutura *versus* atividade dessas moléculas para melhor compreender as particularidades tanto desses inibidores como da própria BCRP (MARIGHETTI et al., 2015).

Para os inibidores, a estrutura molecular também é importante para a atividade moduladora da BCRP. Em um estudo utilizando uma estrutura molecular básica, semelhante à do conhecido inibidor desse transportador de efluxo, o tariquidar, que contém dois anéis aromáticos ligados por uma amina, foi observado que pequenas modificações nos radicais da posição R3 (Ex. inserção de grupos 3-nitrofenil ou 4-nitrofenil ou 4-isopropoxifenil) afetavam de forma importante a atividade dos inibidores. Essas alterações fizeram a molécula ter maior afinidade pelo transportador ou reduzir sua atividade (MARIGHETTI et al., 2013).

Fármacos como elacridar, tariquidar, tamoxifeno, reserpina, Ko143 e novobiocina são conhecidamente inibidores da BCRP (PICK et al., 2011; STAUD; PAVEK, 2005). Vários produtos de origem natural também são descritos como inibidores da BCRP, entre eles flavonoides, canabinoides, terpenoides e, até mesmo, produtos marinhos (PENA-SOLORZANO et al., 2016). Um estudo com células MCF-7, derivadas de adenocarcinoma de mama, demonstrou que os ginsenosídeos (isolados do ginseng) interagem diretamente com a BCRP, inibindo o efluxo da mitoxantrona e aumentando sua absorção pelas células (JIN et al., 2006). Em outro estudo, foi avaliado o potencial inibitório da BCRP de vários flavonoides em células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) e células MCF-7 MX. Nesse trabalho, pendulentina, ayanina e retusina inibiram o efluxo com valores de IC₅₀ relativamente baixos, muito próximos ao valor do controle Ko143, que é o inibidor mais potente e seletivo da BCRP conhecido até o momento (PICK et al., 2011).

Alguns fármacos inibidores da expressão da BCRP são descritos, entre eles fenobarbital, promazina, etoposídeo e perfenazina (BADOLO et al., 2015). Produtos de origem natural também são relatados como seus indutores. Em um estudo, que utilizou técnicas de *Western blotting* e qPCR, foi demonstrada a indução da expressão da *ABCG2* pelos flavonoides naringina e quercetina (KAUR; BADHAN, 2017).

Estes exemplos demonstram que várias moléculas, sejam de fármacos convencionais como de compostos de origem natural,

possuem atividade moduladora da BCRP. Da mesma forma que para a P-gp, o maior conhecimento sobre as particularidades desse transportador e das possíveis moléculas inibidoras poderiam contribuir para a identificação e prevenção das interações, além de auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para fármacos altamente efluxados pela BCRP.

2.4 Mecanismos farmacocinéticos das interações - Alterações no metabolismo por modulação de enzimas do citocromo P450

A biotransformação é o mecanismo predominante de detoxificação e eliminação de fármacos do organismo. Para que moléculas mais lipofílicas sejam eliminadas, elas necessitam passar por processos que aumentem sua polaridade, o que permitirá sua eliminação via bile ou urina (HONÓRIO et al., 2013). O metabolismo também é fundamental para a atividade dos pró-fármacos, que são moléculas que precisam ser biotransformadas para produção dos metabólitos com atividade farmacológica. A utilização de pró-fármacos é um recurso empregado pela indústria farmacêutica para melhorar a absorção e a biodisponibilidade ou para reduzir a toxicidade de alguns fármacos, permitindo o uso de medicamentos com características farmacocinéticas e de toxicidade pouco favoráveis ao uso (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017; TOZER; ROWLAND, 2009).

O metabolismo/biotransformação é dividido em duas fases: o metabolismo de fase I, que envolve reações de oxidação, redução e hidrólise dos fármacos, e o metabolismo de fase II, no qual os fármacos são conjugados com sulfato, metionina, cisteína ou glutatona (CEDERBAUM, 2015). Cada uma destas fases tem um grupo específico de proteínas atuantes. As enzimas do citocromo P450 (CYP450) são as principais responsáveis pelo metabolismo de fase I, enquanto as transferases (UDP-glicuronil transferase, sulfotransferases, N-acetiltransferases, metiltransferases, glutatona-S-transferases) atuam no metabolismo de fase II (CEDERBAUM, 2015; TESTA; CLEMENT, 2015).

As enzimas do CYP450 metabolizam moléculas endógenas, participando da biossíntese do colesterol, da produção de ácidos biliares e hormônios, do metabolismo da vitamina D₃ e da hidroxilação de ácidos graxos (CEDERBAUM, 2015). Os órgãos

de maior importância no metabolismo de fase I são o fígado e o intestino delgado (HONÓRIO et al., 2013; TOZER; ROWLAND, 2009), nos quais as enzimas metabólicas estão localizadas, mais especificamente nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos e no epitélio intestinal. Entretanto, elas podem ser encontradas em outros órgãos e tecidos, tais como cérebro, glândulas adrenais, células do sangue periférico e até no tecido nasal (ALMAZROO et al., 2017).

As enzimas do CYP450 receberam essa denominação em 1961, por apresentarem um pigmento “P” que possuía pico de absorção em 450 nm quando reduzido e ligado ao monóxido de carbono. Devido às limitações metodológicas da época, o DNAC das enzimas do CYP450 só pode ser produzido, pela primeira vez, no início dos anos 80 (NEBERT; RUSSELL, 2002). Atualmente, essa superfamília de heme-proteínas é classificada em famílias 1, 2 e 3, nas quais as enzimas são agrupadas pela especificidade estrutural e similaridade na sequência de aminoácidos (> 40% de similaridade). As famílias, por sua vez, são divididas em subfamílias (> 55% de similaridade) identificadas de A a E (KUMAR et al., 2010; SEVRIUKOVA; POULOS, 2013; TOZER; ROWLAND, 2009). No total, são 42 subfamílias, agrupadas em 18 famílias compostas por enzimas codificadas por 52 genes e 33 pseudogenes (SEVRIUKOVA; POULOS, 2013).

A biotransformação tem papel decisivo para a determinação da dose de um medicamento a ser administrada e para a manutenção das concentrações plasmáticas dos fármacos. Logo, variações na atividade enzimática intestinal ou na expressão dessas enzimas podem afetar a biodisponibilidade dos fármacos, tendo impacto direto na ação farmacológica dos medicamentos (BRANTLEY et al., 2014).

A indução da expressão enzimática ocorre frequentemente por moléculas que são substratos das enzimas do CYP450, pois essa indução acarretará em uma detoxificação mais eficiente (WILLSON; KLIEWER, 2002). Uma lista extensa de substratos, inibidores, indutores e potenciais interações envolvendo as enzimas do CYP450 podem ser encontradas em bancos de dados como o SuperCYP (CHARITÉ, 2017).

Sete enzimas do CYP450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4) metabolizam mais de 90% dos fármacos disponíveis na clínica (HAEFELI; CARLS, 2014). As duas principais enzimas, CYP3A4 e CYP2D6, foram

selecionadas para este estudo por juntas metabolizarem de 75 a 80% dos fármacos disponíveis no mercado e por reconhecidamente atuarem em interações entre plantas medicinais e fármacos (LANGHAMMER; NILSEN, 2014; NCBI, 2017; SEVIOR et al., 2010). A seguir serão expostas, com mais detalhes, as características dessas duas enzimas, e também citadas algumas interações conhecidas, tanto as de fármaco-fármaco como as de planta medicinal-fármaco.

2.4.1 Enzima CYP3A4

A enzima CYP3A4 (Citocromo P450, família 3, subfamília A membro 4) participa do metabolismo de aproximadamente 50% dos fármacos utilizados na clínica. Essa enzima é a enzima CYP450 mais abundante no organismo correspondendo a cerca de 21% do conteúdo proteico das CYP450, seguida pelas enzimas CYP2E1 (15,3%) e CYP2C9 (14,6%) (ACHOUR; BARBER; ROSTAMI-HODJEGAN, 2014; BADOLO et al., 2015; MAZZARI; PRIETO, 2014). A CYP3A4 é altamente expressa no fígado e nos intestinos, principalmente na porção do jejuno, reduzindo a expressão conforme vai ocorrendo o afastamento para as regiões do íleo e do cólon (BERGGREN et al., 2007). O gene que codifica a CYP3A4 contém 27.229 pares de base, 14 éxons e está localizado no cromossomo 7q22.1 humano (NCBI, 2017).

A enzima CYP3A4 catalisa a biotransformação de muitos fármacos, os quais em sua maioria não se relacionam estruturalmente, além de possuir capacidade de acomodar mais de um substrato no sítio catalítico/alostérico (BADOLO et al., 2015; SEVRIOUKOVA; POULOS, 2013). Alguns fármacos, tais como midazolam, triazolam, nifedipino, testosterona e atorvastatina, são substratos bem estabelecidos da CYP3A4. Porém, uma vasta gama de outros fármacos também são substratos dessa enzima, conforme listado no banco de dados SuperCYP (CHARITÉ, 2017; FDA, 2012).

A expressão da CYP3A4 é bastante sensível à exposição a diversos xenobióticos. Em um estudo utilizando hepatócitos humanos, dos 309 compostos testados em relação à modulação da expressão de transportadores e enzimas metabólicas, 72 (23,3%) deles induziram a CYP3A4, e 53 (17,15%) inibiram essa enzima (BADOLO et al., 2015), o que sustenta a afirmação anterior.

Em relação às características moleculares dos inibidores, eles são comumente moléculas lipofílicas, volumosas e com baixo número de doadores de hidrogênio (BADOLO et al., 2015). A CYP3A4 pode ser inibida por alguns antibióticos macrolídeos, fármacos antidepressivos e esteroides, entre outros, por meio de uma inibição reversível ou irreversível (SEVRIOUKOVA; POULOS, 2013).

Determinados fármacos inibidores da CYP3A4 possuem importante relevância clínica pelo fato de sua inibição ter como consequência o aumento drástico dos teores dos substratos na circulação sistêmica, favorecendo o aparecimento de efeitos tóxicos (ALMAZROO et al., 2017). Entre eles, pode-se citar ciclosporina, claritromicina, cetoconazol, itraconazol, ritonavir e eritromicina (KUMAR et al., 2010), sendo o cetoconazol e o ritonavir os dois inibidores mais potentes já conhecidos desta enzima, até o momento (SEVRIOUKOVA; POULOS, 2013).

Modulações da CYP3A4 por produtos de origem natural também são relatadas, sendo as mais conhecidas aquelas associadas com o consumo do suco de *Citrus grandis* (toranja ou pomelo) e o uso de *Hypericum perforatum* (erva-de-são-joão ou hipérico) (CHRUBASIK-HAUSMANN; VLACHOJANNIS; MCLACHLAN, 2018; HANLEY et al., 2011; LIN et al., 2011). Outros produtos como *Piper methysticum* (Kava-Kava), *Vitis vinifera* (semente de uva), *Allium sativum* (alho) (RAUCY, 2003), *Ginkgo biloba* (ginco) (ROBERTSON et al., 2008), *Echinacea purpurea* (equinácea) (SCHRODER-AASEN et al., 2012; AWORTWE; FASINU; ROSENKRANZ, 2014), suco de tomate e sucos comerciais contendo vegetais (SUNAGA et al., 2012; TSUJIMOTO et al., 2016) também são descritos como moduladores da CYP3A4. A inibição dessa enzima é inclusive apresentada por compostos isolados, e como exemplo podem ser citados os flavonoides quercetina (RAUCY, 2003), hesperidina e rutina (ASHOUR et al., 2017), gomisina C e gomisina G, análogos de lignanas isolados da *Schisandra chinensis* (magnolia berry) (ZHAO et al., 2017), dibenzil trissulfeto isolado da *Petiveria alliacea* (rabo-de-gambá) (MURRAY et al., 2016), e resveratrol, este último testado em voluntários humanos saudáveis e gerando inibição da atividade da CYP3A4 (CHOW et al., 2010).

Não apenas a modulação da atividade, mas também da expressão da CYP3A4 por produtos naturais já foi verificada. Em um estudo realizado com um extrato de *Eschscholzia californica*

(papoula-da-califórnia, nativa da América do Norte e do México e utilizada como sedativa, ansiolítica e analgésica) e com os alcaloides isolados dessa planta, foi observado um aumento da expressão de RNAm e da atividade da CYP3A4 (MANDA et al., 2016). Em outro trabalho utilizando piperina (alcaloide encontrado na pimenta-preta), também foi verificada a indução da expressão, tanto da CYP3A4 como da P-gp, em hepatócitos e em células intestinais humanas por esse composto (WANG et al., 2013).

Por ser altamente expressa, metabolizar muitos fármacos, e ser facilmente modulada por xenobióticos, a CYP3A4 possui importância clínica apreciável, principalmente quando se trata de interações.

2.4.2 Enzima CYP2D6

A família CYP2, na qual está inserida a enzima CYP2D6 (Citocromo P450, família 2, subfamília D, membro 6), constitui a maior família do citocromo P450 (NEBERT; RUSSELL, 2002). A CYP2D6 é codificada por um gene que contém 5.351 pares de base, 10 éxons e está localizado no cromossomo 22q13.2 humano (NCBI, 2017). Embora a CYP2D6 represente apenas aproximadamente 2% do total do conteúdo enzimático das CYP450 (2-3% no intestino delgado proximal e 5% no fígado), ela é responsável pelo metabolismo de cerca de 25 a 30% dos fármacos disponíveis no mercado (NCBI, 2017; TOZER; ROWLAND, 2009; YE et al., 2016).

A CYP2D6 está localizada no retículo endoplasmático das células e catalisa reações para a síntese de moléculas endógenas, tais como as do colesterol, de esteroides e de lipídeos. Além disso, esta enzima atua biotransformando fármacos de diversas classes, tais como antidepressivos, antipsicóticos, analgésicos, antitussígenos, bloqueadores *beta*-adrenérgicos, antiarrítmicos e antieméticos (INGELMAN-SUNDBERG, 2005; NIH, 2017; PREISSNER et al., 2010; ZHOU; LIU; LAI, 2009).

Do ponto de vista estrutural, os compostos moduladores da expressão ou da atividade da CYP2D6 apresentam anéis aromáticos, preferencialmente em disposição coplanar e átomos de nitrogênio básicos, os quais são protonados em condições fisiológicas (NCBI, 2017; NIH, 2017; STROBL et al., 1993). São poucos os indutores conhecidos da CYP2D6, sendo que tal atividade, até o momento, foi atribuída a alguns poucos fármacos

(dexametasona, rifampicina e paracetamol) (CHARITÉ, 2017). Porém, vários fármacos inibidores desta enzima já foram identificados, como quinidina, paroxetina, bupropiona e cimetidina. Uma ampla lista de inibidores da CYP2D6 está disponível no banco de dados SuperCYP (BORKAR et al., 2016; CHARITÉ, 2017).

A atividade enzimática da CYP2D6 é modulada também por algumas plantas medicinais, tais como *Hydrastis canadensis* (hidraste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Foeniculum vulgare* (funcho), *Rubus idaeus* (framboesa), *Ginkgo biloba* (ginco), *Ferula asafetida* (assafétida), *Equisetum arvense* (cavalinha), entre outras (AL-JENOOBI et al., 2014; EKOW THOMFORD et al., 2018; HELLMUM; HU; NILSEN, 2007; LANGHAMMER; NILSEN, 2014; SASAKI et al., 2017; SEVIOR et al., 2010). Para alguns metabólitos secundários vegetais também já foi relatada a capacidade de inibição da CYP2D6, tais como polifenóis (ATHUKURI; NEERATI, 2016), flavonoides (SONG et al., 2013), e os alcaloides cefalina e emetina (ASANO et al., 2001; YE et al., 2016b).

A enzima CYP2D6 será abordada em três dos capítulos seguintes desta Tese como alvo do estudo de interações entre plantas medicinais e fármacos. Assim, dados mais específicos sobre a sua modulação, função e expressão serão discutidos no decorrer dos mesmos.

2.5 Plantas medicinais selecionadas para os estudos de interação

Popularmente, as plantas medicinais são utilizadas para tipos específicos de enfermidades. Algumas delas possuem atividades farmacológicas comprovadas cientificamente, bem como seus compostos bioativos são conhecidos. Contudo, o uso medicinal da maioria das preparações vegetais ocorre apenas com base no conhecimento popular empírico, sem qualquer comprovação científica (AJAZUDDIN et al., 2014).

A partir de uma revisão bibliográfica prévia e com base na RENISUS, foram selecionadas dez plantas medicinais para abordagem nesta Tese. As plantas escolhidas possuem propriedades medicinais descritas e para algumas delas as interações já foram sugeridas na literatura. Entretanto, mesmo havendo informações preliminares sobre tais interações, para

muitas delas não se conhece os mecanismos pelos quais elas ocorrem, quais as vias estão sendo afetadas e quais os compostos estão associados, contexto no qual este trabalho visa a contribuir.

O Quadro I. 1 lista as plantas medicinais escolhidas para este estudo e a finalidade do uso tradicional de cada uma delas, bem como seus efeitos farmacológicos comprovados cientificamente.

Quadro I. 1 - Plantas medicinais selecionadas, indicações de uso e efeitos farmacológicos comprovados.

Planta medicinal	Nome popular	RENISUS	Indicações de uso	Alguns efeitos farmacológicos comprovados*
<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofra	Sim	Utilizada para a redução dos altos níveis de colesterol e triglicerídeos (WILLIAMSON et al., 2009); para problemas no coração e nas artérias; para tratar diabetes (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012); para problemas no fígado, na bile e nos rins (GRANDI, 2014; WILLIAMSON et al., 2009).	Antiaterosclerótico (<i>in vivo</i>); antioxidante (<i>in vivo</i>) (CREVAR-SAKAC et al., 2016); hepatoprotetor (<i>in vivo</i>) (SAYED et al., 2018); hipoglicemiante (<i>in vivo</i>) (SALEM et al., 2017); hipotrigliceridemiante (<i>in vivo</i>) (REZAZADEH et al., 2018).
<i>Matricaria recutita</i>	Camomila	Sim	Usada para tratar a insônia, como calmante, para inflamações da pele e da boca (GRANDI, 2014); para problemas no estômago e no intestino (WILLIAMSON et al., 2009); como analgésico, antialérgico, entre diversas outras aplicações (SINGH et al., 2011).	Anti-inflamatório (<i>in vivo</i>) (AL-HINDAWI et al., 1989); antimicrobiano (<i>in vitro</i>) (MUNIR et al., 2014); hepatoprotetor (<i>in vivo</i>) (SEBAI et al., 2015); inibidor da absorção de glicose (<i>in vivo</i>) (JABRI et al., 2017); redutor do sangramento gengival (<i>in vivo</i>) (BATISTA et al., 2014); sedativo (<i>in vivo</i>) (ABDULLAHZADEH; MATOURYPOUR; NAJI, 2017); Benéfico para mucosite (<i>in vivo</i>) (ARDAKANI et al., 2016).

<p><i>Camellia sinensis</i></p>	<p>Chá-verde</p>	<p>Não</p>	<p>Empregada para a redução dos altos níveis de colesterol; para doenças do estômago, intestino e do coração; para a prevenção do câncer de próstata; para perda de peso (WILLIAMSON et al., 2009); como estimulante, expectorante e purgativo (GRANDI, 2014).</p>	<p>Anti-inflamatório (<i>in vivo</i>) (CHATTOPADHYAY et al., 2004); antioxidante (<i>in vitro</i>) (IZZREEN; FADZELLY, 2012); cardioprotetor (<i>in vivo</i>) (KHAN et al., 2014); hipoglicemiante (<i>in vivo</i>) (HAIDARI et al., 2013); hipolipidemiante (<i>in vivo</i>) (AMANOLAH; RAKHSHANDE, 2013); neuroativo (<i>in vivo</i>) (MANCINI et al., 2017); neuroprotetor (<i>in vivo</i>) (SCHIMIDT et al., 2017); preventivo do câncer (<i>in vivo</i>) (SUR; PANDA, 2017); redutor de peso (<i>in vivo</i>) (AMANOLAH; RAKHSHANDE, 2013).</p>
<p><i>Cecropia glaziovii</i></p>	<p>Embaúba</p>	<p>Não</p>	<p>Utilizada como anti-inflamatória, para o tratamento da bronquite e da tosse; para eliminação de líquido; para redução da pressão arterial; para o corrimento vaginal; para problemas no coração e para a diabetes (COSTA et al., 2011; GRANDI, 2014).</p>	<p>Ansiolítico (<i>in vivo</i>) (ROCHA; LAPA; LIMA, 2002); antiácido (<i>in vivo</i>) (SOUCCAR et al., 2008); antidepressivo (<i>in vitro, in vivo e ex vivo</i>) (ROCHA et al., 2007); anti-inflamatório (<i>in vivo</i>); antioxidante (<i>in vitro</i>) (MULLER et al., 2016); antiviral (<i>in vitro</i>) (PETRONILHO et al., 2012; SILVA et al., 2010); hepatoprotetor (<i>in vivo</i>) (PETRONILHO et al., 2012); hipoglicêmico (<i>in vivo</i>); vasorelaxante (<i>in vitro</i>) (AREND et al., 2015); hipotensivo (<i>in vivo</i>) (LIMA-LANDMAN et al., 2007).</p>

<p><i>Echinacea</i> sp.</p>	<p>Equinácea</p>	<p>Não</p>	<p>As plantas desse gênero são utilizadas como imunoestimulantes; no tratamento de diferentes infecções, bacterianas e virais; para tratar gripe, resfriado, bronquite, infecções de garganta, dor de dente, infecções urinárias, queimaduras, alergias e diversos tipos de infecções na pele (HUDSON, 2012; SHARIFI-RAD et al., 2018; WILLIAMSON et al., 2009).</p>	<p>Antiadesão bacteriana (<i>in vitro</i>) (VIMALANATHAN et al., 2017); antibacteriano (<i>in vitro</i>) (SHARIFI-RAD et al., 2018); antidiabético (<i>in vitro</i>); anti-hipertensivo (<i>in vitro</i>) (CHIOU et al., 2017); anti-inflamatório (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>) (OLAH et al., 2017); antioxidante (<i>in vitro</i>) (SHARIFI-RAD et al., 2018); antiviral (<i>in vitro</i>) (HUDSON; VIMALANATHAN, 2011); imunomodulador (<i>in vivo</i>) (PARK et al., 2018).</p>
<p><i>Cimicifuga racemosa</i></p>	<p>Erva-de-são-cristóvão</p>	<p>Não</p>	<p>As plantas desse gênero são utilizadas no tratamento dos sintomas da menopausa e problemas menstruais (DIETZ et al., 2016); como antirreumática, antitussígena e sedativa (WILLIAMSON et al., 2009); para dores de cabeça, de dente, de garganta e aftas (GUO et al., 2017).</p>	<p>Antidepressivo (<i>in vivo</i>) (WINTERHOFF et al., 2003); antidiabético (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>) (MOSER et al., 2014); anti-inflamatório (<i>ex vivo</i>) (SCHMID et al., 2009); antioxidante (<i>in vitro</i>) (SZYMCZAK et al., 2015); antitumoral (<i>in vitro</i>) (HOSTANSKA et al., 2004); contra sintomas da menopausa (<i>in vivo</i>) (DREWE; ZIMMERMANN; ZAHNER, 2013); osteoprotetor (<i>in vivo</i>) (SEIDLOVA-WUTTKE et al., 2012).</p>

<p><i>Ilex paraguariensis</i></p>	<p>Eva- mate</p>	<p>Não</p>	<p>Utilizada para perda de peso, redução dos altos níveis de colesterol e triglicérides (DICKEL; RATES; RITTER, 2007); como estimulante, diurética e analgésica (WILLIAMSON et al., 2009).</p>	<p>Antiaterosclerótico (<i>in vivo</i>) (SANTIAGO et al., 2017); anticonvulsivante (<i>in vivo</i>) (BRANCO et al., 2013); anti-inflamatório (<i>in vivo</i>) (LUZ et al., 2016); antiobesidade (<i>in vivo</i>) (CONCEICAO et al., 2017); antiviral (<i>in vitro</i>) (LUCKEMEYER et al., 2012); cardioprotetor (<i>ex vivo</i>) (CAHUE et al., 2017); hipolipidemiante (<i>in vivo</i>) (BOAVENTURA et al., 2012); neuroprotetor (<i>in vivo</i>) (BRANCO et al., 2013); redutor do estresse oxidativo (<i>in vivo</i>) (PEREIRA et al., 2017).</p>
<p><i>Ginkgo biloba</i></p>	<p>Ginco</p>	<p>Não</p>	<p>Utilizada para o melhoramento das funções cognitivas, distúrbios cerebrovasculares, asma, sintomas da doença da altitude, em casos de demência e perda de memória (WILLIAMSON et al., 2009).</p>	<p>Anti-inflamatório (<i>in vivo</i>) (KAUR; SHARMA; NEHRU, 2018); antineuroinflamatório (<i>in vitro</i>) (GARGOURI et al., 2018); antiparkinsoniano (<i>in vivo</i>) (KUANG et al., 2018); antiproliferativo (<i>in vitro</i>) (ZHAO et al., 2013); cardioprotetor (<i>in vivo</i>) (MESQUITA et al., 2017); estimulante serotoninérgico (<i>in vivo</i>) (BANIN et al., 2017); benéfico para cognição (<i>in vivo</i>) (TAN et al., 2015); efeitos neuropsiquiátricos (<i>in vivo</i>) (TAN et al., 2015); protetor do miocárdio (<i>in vivo</i>) (TANG et al., 2017).</p>
<p><i>Bauhinia forficata</i></p>	<p>Pata- de- vaca</p>	<p>Sim</p>	<p>Utilizada como diurética e no tratamento da diabetes (GRANDI, 2014; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).</p>	<p>Anticoagulante (<i>in vitro</i>); fibrinogenolítico (<i>in vitro</i>) (OLIVEIRA et al., 2005); antifúngico (<i>in vitro</i>) (ALVES et al., 2017); antioxidante (<i>in vitro</i>) (FRANCO et al., 2018); bactericida (<i>ex vivo</i>) (FERREIRA-FILHO et al., 2018); citotóxico (<i>in vitro</i>); inibidor da adesão celular (<i>in vitro</i>) (SILVA et al., 2014).</p>

<i>Glycine max</i>	Soja	Sim	Usada para reduzir altos níveis de glicose; para prevenção do câncer; para osteoporose e doenças cardíacas (WILLIAMSON et al., 2009); para o tratamento dos sintomas da menopausa (DIETZ et al., 2016); como laxante, remineralizante, sudorífera e tônica (GRANDI, 2014).	Antiangiogênico (<i>in vivo</i>) (KANG; JIN; ZHANG, 2009); antidiabético (<i>in vitro</i>) (HUANG et al., 2016); antilipidêmico (<i>in vivo</i>) (OLIVA et al., 2011); anti-inflamatório (<i>ex vivo</i>) (KANG et al., 2005); antineoplásico (<i>in vivo</i>) (KANG et al., 2009); antiosteoporose (<i>in vivo</i>) (BYUN; LEE, 2010); cardioprotetor (<i>in vivo</i>) (GOODMAN-al., 2003); contra os sinais da menopausa (<i>in vivo</i>) (LIMA et al., 2014); preventivo do câncer (<i>in vivo</i>) (HAMILTON-REEVES et al., 2008).
--------------------	------	-----	--	--

* Os efeitos descritos são resultantes da análise de preparações a partir das plantas medicinais ou de compostos delas isolados.

Detalhes sobre as interações envolvendo as plantas listadas e as enzimas e transportadores em estudo neste trabalho serão descritos no decorrer das discussões dos demais capítulos desta Tese.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, H. M. et al. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. **J Adv Res**, v. 6, n. 1, p. 45-62, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685543> >.

ABDEL-TAWAB, M. Do We Need Plant Food Supplements? A Critical Examination of Quality, Safety, Efficacy, and Necessity for a New Regulatory Framework. **Planta Med**, v. 84, n. 06-07, p. 372-93, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29220861> >.

ABOU-RIZK, J.; ALAMEDDINE, M.; NAJA, F. Prevalence and Characteristics of CAM Use among People Living with HIV and AIDS in Lebanon: Implications for Patient Care. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2016, p. 12, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28050191> >.

ABUHELWA, A. Y. et al. Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 112, n. 2017, p. 24, Nov 30 2017. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27914234> >.

ACHOUR, B.; BARBER, J.; ROSTAMI-HODJEGAN, A. Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes and their intercorrelations: a meta-analysis. **Drug Metab Dispos**, v. 42, n. 8, p. 1349-56, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24879845> >.

AHLIN, G. et al. Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. **J Med Chem**, v. 51, n. 19, p. 5932-42, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18788725> >.

AL-JENOABI, F. I. et al. Modulation of CYP2D6 and CYP3A4 metabolic activities by *Ferula asafetida* resin. **Saudi Pharm J**, v. 22, n. 6, p. 564-9, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25561870> >.

ALISSA, E. M. Medicinal herbs and therapeutic drugs interactions. **Ther Drug Monit**, v. 36, n. 4, p. 413-22, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452064> >.

ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clin Liver Dis**, v. 21, n. 1, p. 20, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27842765> >.

AMIN, M. L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. **Drug Target Insights**, v. 7, p. 27-34, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24023511> >.

ARIMANY-NARDI, C.; KOEPESELL, H.; PASTOR-ANGLADA, M. Role of SLC22A1 polymorphic variants in drug disposition, therapeutic responses, and drug-drug interactions. **Pharmacogenomics J**, v. 15, n. 6, p. 473-87, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26526073> >.

ARSLAN, D.; TURAL, D.; AKAR, E. Herbal administration and interaction of cancer treatment. **J Palliat Med**, v. 16, n. 11, p. 1466-76, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24102459> >.

ASANO, T. et al. Metabolism of ipecac alkaloids cephaeline and emetine by human hepatic microsomal cytochrome P450s, and their inhibitory effects on P450 enzyme activities. **Biol Pharm Bull**, v. 24, n. 6, p. 678-82, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11411558> >.

ATHUKURI, B. L.; NEERATI, P. Enhanced oral bioavailability of metoprolol with gallic acid and ellagic acid in male Wistar rats: involvement of CYP2D6 inhibition. **Drug Metab Pers Ther**, v. 31, n. 4, p. 229-34, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27875319> >.

AWORTWE, C.; FASINU, P. S.; ROSENKRANZ, B. Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges. **J Pharm Pharm Sci**, v. 17, n. 1, p. 19, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735758> >.

AWORTWE, C. et al. Critical evaluation of causality assessment of herb-drug interactions in patients. **Br J Clin Pharmacol**, v. 84, n. 4, p. 679-93, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29363155> >.

AYDIN AVCI, I.; KOC, Z.; SAGLAM, Z. Use of complementary and alternative medicine by patients with cancer in northern Turkey: analysis of cost and satisfaction. **J Clin Nurs**, v. 21, n. 5-6, p. 677-88, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21714820> >.

BADOLO, L. et al. Evaluation of 309 molecules as inducers of CYP3A4, CYP2B6, CYP1A2, OATP1B1, OCT1, MDR1, MRP2, MRP3 and BCRP in cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture. **Xenobiotica**, v. 45, n. 2, p. 177-87, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183402> >.

BAE, J. K. et al. Korean red ginseng extract enhances paclitaxel distribution to mammary tumors and its oral bioavailability by P-glycoprotein inhibition. **Xenobiotica**, p. 10, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189791> >.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Rev. bras. farmacogn**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2010000600027&script=sci_abstract&tlng=pt>.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 44, n. 1, p. 301-12, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274897> >.

BARBIERI, R. et al. Agricultural Biodiversity in Southern Brazil: Integrating Efforts for Conservation and Use of Neglected and Underutilized Species. **Sustainability**, v. 6, n. 2, p. 741-57, 2014. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/980327/agricultural-biodiversity-in-southern-brazil> >.

integrating-efforts-for-conservation-and-use-of-neglected-and-underutilized-species >.

BARENDT, W. M.; WRIGHT, S. H. The human organic cation transporter (hOCT2) recognizes the degree of substrate ionization. **J Biol Chem**, v. 277, n. 25, p. 22491-6, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953440> >.

BAXTER, K. **Stockley's Drug Interactions**. 9. London: Pharmaceutical Press, 2010. 1700 p.

BERGGREN, S. et al. Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. **Mol Pharm**, v. 4, n. 2, p. 252-7, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17263554> >.

BLACKSELL, L.; BYARD, R. W.; MUSGRAVE, I. F. Forensic problems with the composition and content of herbal medicines. **J Forensic Leg Med**, v. 23, p. 19-21, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24661699> >.

BORKAR, R. M. et al. An evaluation of the CYP2D6 and CYP3A4 inhibition potential of metoprolol metabolites and their contribution to drug-drug and drug-herb interaction by LC-ESI/MS/MS. **Biomed Chromatogr**, v. 30, n. 10, p. 1556-72, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27006091> >.

BRAGA, F. C.; RATES, S. M. K.; SIMÕES, C. M. O. Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 6, 486 p.

BRANTLEY, S. J. et al. Herb-drug interactions: challenges and opportunities for improved predictions. **Drug Metab Dispos**, v. 42, n. 3, p. 301-17, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335390> >.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Departamento de atenção Básica.

Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, 2006. 92 p.

_____. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos: Brasília: Ministério da Saúde, 2009a. 136 p.

_____. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.** Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: Brasília: Ministério da Saúde 2009b. 2 p.

_____. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 126 p.

_____. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica.** Departamento de atenção Básica: Brasília: Ministério da Saúde 31, 2012. 156 p.

_____. Biodiversidade Brasileira. Brasil, 2014. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira> >.

_____. **Memento Fitoterápico : Farmacopéia Brasileira.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016. 115 p.

CASCORBI, I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. **Handb Exp Pharmacol**, n. 201, p. 261-83, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21103972> >.

CEDERBAUM, A. I. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. **Redox Biol**, v. 4, p. 60-73, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498968> >.

CESAR-RAZQUIN, A. et al. A Call for Systematic Research on Solute Carriers. **Cell**, v. 162, n. 3, p. 478-87, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26232220> >.

CHAN, E. et al. Interactions between traditional Chinese medicines and Western therapeutics. **Curr Opin Drug Discov Devel**, v. 13, n. 1, p. 50-65, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047146> >.

CHANG, K. H. et al. Complementary and alternative medicine use in oncology: a questionnaire survey of patients and health care professionals. **BMC Cancer**, v. 11, p. 9, 2011 Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609461> >.

CHARITÉ. **SuperCYP**. Germany: Structural Bioinformatics Group - Institute of Molecular Biology and Bioinformatics, 2017. Disponível em: < <http://bioinformatics.charite.de/supercyp/> >.

CHEN, J. et al. Tropane alkaloids as substrates and inhibitors of human organic cation transporters of the SLC22 (OCT) and the SLC47 (MATE) families. **Biol Chem**, v. 398, n. 2, p. 237-49, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27676604> >.

CHIEN, H. C. et al. Rapid Method To Determine Intracellular Drug Concentrations in Cellular Uptake Assays: Application to Metformin in Organic Cation Transporter 1-Transfected Human Embryonic Kidney 293 Cells. **Drug Metab Dispos**, v. 44, n. 3, p. 356-64, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700958> >.

CHOI, Y. H.; CHIN, Y. W.; KIM, Y. G. Herb-drug interactions: focus on metabolic enzymes and transporters. **Arch Pharm Res**, v. 34, n. 11, p. 1843-63, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22139685> >.

CHRUBASIK-HAUSMANN, S.; VLACHOJANNIS, J.; MCLACHLAN, A. J. Understanding drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): impact of hyperforin content. **J Pharm Pharmacol**, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29411879> >.

COHEN, P. A.; ERNST, E. Safety of herbal supplements: a guide for cardiologists. **Cardiovasc Ther**, v. 28, n. 4, p. 246-53, 2010.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20633025> >.

COUROUSSE, T.; GAUTRON, S. Role of organic cation transporters (OCTs) in the brain. **Pharmacol Ther**, v. 146, p. 94-103, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25251364> >.

DASH, R. P. et al. Increased intestinal P-glycoprotein expression and activity with progression of diabetes and its modulation by epigallocatechin-3-gallate: Evidence from pharmacokinetic studies. **Eur J Pharmacol**, v. 767, p. 67-76, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26460146> >.

DEFERME, S.; VAN GELDER, J.; AUGUSTIJNS, P. Inhibitory effect of fruit extracts on P-glycoprotein-related efflux carriers: an *in-vitro* screening. **J Pharm Pharmacol**, v. 54, n. 9, p. 1213-9, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12356275> >.

DOYLE, L. A. et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15665-70, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861027> >.

DROZDZIK, M. et al. Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. **Mol Pharm**, v. 11, n. 10, p. 3547-55, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25158075> >.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res**, v. 112, p. 4-29, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812486> >.

EARDLEY, S. et al. A systematic literature review of complementary and alternative medicine prevalence in EU. **Forsch Komplementmed**, v. 19 Suppl 2, p. 18-28, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23883941> >.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Front Pharmacol**, v. 4, p. 10, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24454289> >.

EKOW THOMFORD, N. et al. Bush mint (*Hyptis suaveolens*) and spreading hogweed (*Boerhavia diffusa*) medicinal plant extracts differentially affect activities of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 enzymes. **J Ethnopharmacol**, v. 211, p. 58-69, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28942133> >.

ESTUDANTE, M. et al. Intestinal drug transporters: an overview. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 65, n. 10, p. 1340-56, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041352> >.

ESTUDANTE, M. et al. Insights into solute carriers: physiological functions and implications in disease and pharmacokinetics. **R Soc Chem**, v. 2016, n. 7, p. 17, 2016. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/md/c6md00188b#!divAbstract> >.

FAHRMAYR, C.; FROMM, M. F.; KONIG, J. Hepatic OATP and OCT uptake transporters: their role for drug-drug interactions and pharmacogenetic aspects. **Drug Metab Rev**, v. 42, n. 3, p. 380-401, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20100011> >.

FDA (Food and Drug Administration). **Guidance for Industry Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations**. U.S. Department of Health and Human Services. United States: Food and Drug Administration, 2012. 79 p.

FIRKINS, R. et al. The use of complementary and alternative medicine by patients in routine care and the risk of interactions. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 144, n. 3, p. 551-7, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29356888> >.

FRANÇA, I. S. X. D. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev Bras Enferm**. Brasília. 61: 8 p. 2008. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672008000200009 >

FRANÇA, S. D. C. Bioprocessos inivadores para a produção de metabólitos ativos de plantas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 5, 486 p.

FROMM, M. F.; KIM, R. B. **Drug Transporters**. Springer, 2011. 457 p.

GHOSH, N. et al. Herb and Drug Interaction. In: MANDAL, S. C.;MANDAL, V., et al (Ed.). **Natural Products and Drug Discovery: An Integrated Approach**: Elsevier, 2018. cap. 17, 467 p.

GORBOULEV, V. et al. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. **DNA Cell Biol**, v. 16, n. 7, p. 871-81, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9260930> >.

GOTTA, M.; MAYER, C. A.; HUEBNER, J. Use of complementary and alternative medicine in patients with multiple sclerosis in Germany. **Complement Ther Med**, v. 36, p. 113-7, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29458916> >.

GRUNDEMANN, D. et al. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. **Nature**, v. 372, n. 6506, p. 549-52, 1994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7990927> >.

HAGENBUCH, B.; MEIER, P. J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. **Pflugers Arch**, v. 447, n. 5, p. 653-65, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14579113> >.

HAGENBUCH, B.; STIEGER, B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 396-412, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23506880> >.

HALL, H. et al. Nurses' communication regarding patients' use of complementary and alternative medicine. **Collegian**, v. 25, n. 2018, p. 7, 2018. Disponível em: < [https://www.collegianjournal.com/article/S1322-7696\(17\)30102-6/fulltext](https://www.collegianjournal.com/article/S1322-7696(17)30102-6/fulltext) >.

HAN, T. K. et al. Organic cation transporter 1 (OCT1/mOct1) is localized in the apical membrane of Caco-2 cell monolayers and enterocytes. **Mol Pharmacol**, v. 84, n. 2, p. 182-9, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680637> >.

HANLEY, M. J. et al. The effect of grapefruit juice on drug disposition. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 7, n. 3, p. 267-86, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254874> >.

HEDIGER, M. A. BioParadigms. 2018. Disponível em: < <http://www.bioparadigms.org/slc/intro.htm> >.

HEDIGER, M. A. et al. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 95-107, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23506860> >.

HEDIGER, M. A. et al. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins: Introduction. **Pflugers Arch**, v. 447, n. 5, p. 465-8, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14624363> >.

HELLUM, B. H.; HU, Z.; NILSEN, O. G. The induction of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by six trade herbal products in cultured primary human hepatocytes. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 100, n. 1, p. 23-30, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17214607> >.

HERNANDES, L. S.; KATO, E. T. M.; BACCHI, E. M. Alcaloides tropânicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 23, 486 p.

HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee). **Gene Families Index**: Vertebrate Gene Nomenclature Committee 2018. < Disponível em: <https://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/> >.

HILLGREN, K. M. et al. Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium. **Clin Pharmacol Ther**, v. 94, n. 1, p. 52-63, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588305> >.

HONÓRIO, K. M.; MODA, T. L.; ANDRICOPULO, A. D. Pharmacokinetic Properties and *In Silico* ADME Modeling in Drug Discovery. **J Med Chem**, v. 9, p. 14, 2013. Disponível em: < <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/mc/2013/00000009/00000002/art00002?crawler=true> >.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. **Pharmacogenomics J**, v. 5, n. 1, p. 6-13, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492763> >.

ITC (International Transporter Consortium). Membrane transporters in drug development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 3, p. 215-36, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190787> >.

_____. International Transporter Consortium: Advancing Transporter Science Relevant to Drug Development, 2018. Disponível em: < <https://www.itc-transporter.org/> >.

JACQUEMIN, E. et al. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. **PNAS**, v. 91, n. 1, p. 133-

7, 1994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8278353> >.

JIN, J. et al. Metabolites of ginsenosides as novel BCRP inhibitors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 345, n. 4, p. 1308-14, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16729968> >.

JONES, A. W. Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry. **Drug Test Anal**, v. 3, n. 6, p. 337-44, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21698778> >.

JONES, G. The discovery and synthesis of the nutritional factor vitamin D. **Int J Paleopathol**, p. 4, 2018. Disponível em: < https://ac.els-cdn.com/S187998171730150X/1-s2.0-S187998171730150X-main.pdf?_tid=a22cf3ea-c833-41d6-a47b-694d744af00a&acdnat=1521050301_786e789c0f577e1e599e6ef4c027d53f >.

JULIANO, R. L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug in chinese hamster ovary cell mutants. **Biochim Biophys Acta**, v. 455, p. 10, 1976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/990323> >.

KAUR, M.; BADHAN, R. K. Phytochemical mediated-modulation of the expression and transporter function of breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier: An *in-vitro* study. **Brain Res**, v. 1654, p. 9-23, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27771282> >.

KELSO-CHICHETTO, N. E. et al. Complementary and Alternative Medicine Use for HIV Management in the State of Florida: Medical Monitoring Project. **J Altern Complement Med**, v. 22, n. 11, p. 880-6, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27631385> >.

KEMPPAINEN, L. M. et al. Use of complementary and alternative medicine in Europe: Health-related and sociodemographic determinants. **Scand J Public Health**, v. 46, n. 4, p. 448-55, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28975853> >.

KHAN, M. et al. Enhancing Activity of Anticancer Drugs in Multidrug Resistant Tumors by Modulating P-Glycoprotein through Dietary Nutraceuticals. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 16, p. 6831-9, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26514453> >.

KIDO, Y.; MATSSON, P.; GIACOMINI, K. M. Profiling of a prescription drug library for potential renal drug-drug interactions mediated by the organic cation transporter 2. **J Med Chem**, v. 54, n. 13, p. 4548-58, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21599003> >.

KIM, R. B. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. **Drug Metab Rev**, v. 34, n. 1-2, p. 47-54, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11996011> >.

KOC, Z.; CINARLI, T. The determination of Complementary and Alternative Medicine use in patients presenting at the emergency room. **Complement Ther Clin Pract**, v. 31, p. 164-9, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29705450> >.

KOEPSSELL, H. Role of organic cation transporters in drug-drug interaction. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 11, n. 10, p. 1619-33, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26206523> >.

KONISHI, T. et al. Inhibitory effect of a bitter melon extract on the P-glycoprotein activity in intestinal Caco-2 cells. **Br J Pharmacol**, v. 143, n. 3, p. 379-87, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351776> >.

KOSHIBA, S. et al. Human ABC transporters ABCG2 (BCRP) and ABCG4. **Xenobiotica**, v. 38, n. 7-8, p. 863-88, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668433> >.

KULLAK-UBLICK, G. A. et al. Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1274-

82, 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7557095> >.

KUMAR, Y. S. et al. P-Glycoprotein- and cytochrome P-450-mediated herbal drug interactions. **Drug Metabol Drug Interact**, v. 25, n. 1-4, p. 3-16, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21417789> >.

LAI, R. E.; JAY, C. E.; SWEET, D. H. Organic solute carrier 22 (SLC22) family: Potential for interactions with food, herbal/dietary supplements, endogenous compounds, and drugs. **J Food Drug Anal**, v. 26, n. 2S, p. S45-S60, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29703386> >.

LANGHAMMER, A. J.; NILSEN, O. G. *In vitro* inhibition of human CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A4 by six herbs commonly used in pregnancy. **Phytother Res**, v. 28, n. 4, p. 603-10, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843424> >.

LATTE-NAOR, S. et al. Influence of family on expected benefits of complementary and alternative medicine (CAM) in cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 26, n. 6, p. 2063-9, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29368030> >.

LEVY, I. et al. Adverse events associated with interactions with dietary and herbal supplements among inpatients. **Br J Clin Pharmacol**, v. 83, n. 4, p. 836-45, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27759172> >.

LI, J.; BLUTH, M. H. Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy. **Pharmgenomics Pers Med**, v. 4, p. 11-33, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226051> >.

LI, Y.; REVALDE, J.; PAXTON, J. W. The effects of dietary and herbal phytochemicals on drug transporters. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 116, p. 45-62, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27637455> >.

LIN, S. P. et al. *Citrus grandis* peel increases the bioavailability of cyclosporine and tacrolimus, two important immunosuppressants,

in rats. **J Med Food**, v. 14, n. 11, p. 1463-8, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883002> >.

LOZANO, E. et al. Genetic Heterogeneity of SLC22 Family of Transporters in Drug Disposition. **J Pers Med**, v. 8, n. 2, p. 27, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29659532> >.

LU, X. et al. The inhibitory effects of eighteen front-line antibiotics on the substrate uptake mediated by human Organic anion/cation transporters, Organic anion transporting polypeptides and Oligopeptide transporters in *in vitro* models. **Eur J Pharm Sci**, v. 115, p. 132-43, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29307856> >.

MAEDA, K.; SUGIYAMA, Y. Transporter biology in drug approval: regulatory aspects. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 711-8, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23506904> >.

MAKI, N.; HAFKEMEYER, P.; DEY, S. Allosteric modulation of human P-glycoprotein. Inhibition of transport by preventing substrate translocation and dissociation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 18132-9, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642584> >.

MANDA, V. K. et al. Modulation of CYPs, P-gp, and PXR by *Eschscholzia californica* (California Poppy) and Its Alkaloids. **Planta Med**, v. 82, n. 6, p. 551-8, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27054913> >.

MAO, Q.; UNADKAT, J. D. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. **AAPS J**, v. 7, n. 1, p. E118-33, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146333> >.

MARCHETTI, S. et al. Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). **Oncologist**, v. 12, n. 8, p. 927-

41, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17766652> >.

MARIGHETTI, F. et al. Synthesis and quantitative structure-activity relationships of selective BCRP inhibitors. **ChemMedChem**, v. 8, n. 1, p. 125-35, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150210> >.

MARIGHETTI, F. et al. Scaffold identification of a new class of potent and selective BCRP inhibitors. **ChemMedChem**, v. 10, n. 4, p. 742-51, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25735648> >.

MARQUEZ, B.; VAN BAMBEKE, F. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 600-20, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039335> >.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **J Clin Pharmacol**, v. 42, n. 6, p. 620-43, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12043951> >.

MASAKA, Y. et al. Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. **Eur J Pharm Sci**, v. 29, n. 3-4, p. 240-50, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16876987> >.

MAZZARI, A. L.; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 12, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071580> >.

MEIER, Y. et al. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. **Drug Metab Dispos**, v. 35, n. 4, p. 590-4, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220238> >.

MULLER, J. et al. Expression, regulation and function of intestinal drug transporters: an update. **Biol Chem**, v. 398, n. 2, p. 175-92, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27611766> >.

MURAKAMI, T. Absorption sites of orally administered drugs in the small intestine. **Expert Opin Drug Discov**, v. 12, n. 12, p. 1219-32, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28920464> >.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). **GenBank®**. Bethesda: U.S. National Library of Medicine 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> >.

NEBERT, D. W.; RUSSELL, D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. **Lancet**, v. 360, n. 9340, p. 1155-62, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12387968> >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-61, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26852623> >.

NIH (National Institutes of Health). **2016 Strategic Plan**. U.S. Department of Health and Human Services. United States: National Institutes of Health, 2016. 45 p.

_____. **Genetics Home Reference**. United State, Your Guide to Understanding Genetic Conditions, 2017. Disponível em: < <https://ghr.nlm.nih.gov/> >.

OGA, E. F.; SEKINE, S.; HORIE, T. *Ex Vivo* and *In Vivo* Investigations of the Effects of Extracts of *Vernonia amygdalina*, *Carica papaya* and *Tapinanthus sessilifolius* on Digoxin Transport and Pharmacokinetics: Assessing the Significance on Rat Intestinal P-glycoprotein Efflux. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 28, n. 4, p. 314-20, 2013.

OGA, E. F. et al. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions: Insight into Mechanisms and Consequences. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v. 41, n. 2, p. 93-108, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26311243> >.

OWENS, C.; BAERGEN, R.; PUCKETT, D. Online sources of herbal product information. **Am J Med**, v. 127, n. 2, p. 109-15, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24290486> >.

PENA-SOLORZANO, D. et al. ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators. **Med Res Rev**, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28005280> >.

PICK, A. et al. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Bioorg Med Chem**, v. 19, n. 6, p. 2090-102, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21354800> >.

PLOUZEK, C. A. et al. Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of multidrug resistance *in vitro* by rosemary extract. **Eur J Cancer**, v. 35, n. 10, p. 1541-5, 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673984> >.

POSADZKI, P.; WATSON, L.; ERNST, E. Herb-drug interactions: an overview of systematic reviews. **Br J Clin Pharmacol**, v. 75, n. 3, p. 603-18, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22670731> >.

POSADZKI, P. et al. Prevalence of use of complementary and alternative medicine (CAM) by patients/consumers in the UK: systematic review of surveys. **Clin Med (Lond)**, v. 13, n. 2, p. 126-31, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681857> >.

PREISSNER, S. et al. SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Database issue, p. D237-43, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934256> >.

REDDY, D. R. et al. Natural flavonoids silymarin and quercetin improve the brain distribution of co-administered P-gp substrate drugs. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 9, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27652191> >.

ROBERTSON, S. M. et al. Effect of *Ginkgo biloba* extract on lopinavir, midazolam and fexofenadine pharmacokinetics in healthy subjects. **Curr Med Res Opin**, v. 24, n. 2, p. 591-9, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18205997> >.

ROTH, M.; OBADAT, A.; HAGENBUCH, B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 5, p. 1260-87, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013971> >.

SALA-RABANAL, M. et al. Polyamine transport by the polyspecific organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3. **Mol Pharm**, v. 10, n. 4, p. 1450-8, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458604> >.

SASAKI, T. et al. Effect of health foods on cytochrome P450-mediated drug metabolism. **J Pharm Health Care Sci**, v. 3, p. 14, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28496987> >.

SATLIN, L. M.; AMIN, V.; WOLKOFF, A. W. Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃-exchange. **J Biol Chem**, v. 272, n. 42, p. 26340-5, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334206> >.

SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, n. 1, p. 3-29, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535572> >.

SEVIOR, D. K. et al. Rapid screening of commercially available herbal products for the inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes using the N-in-one cocktail. **Xenobiotica**, v. 40, n. 4, p. 245-54, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20218935> >.

SEVRIOUKOVA, I. F.; POULOS, T. L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. **Dalton Trans**, v. 42, n. 9, p. 3116-26, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23018626> >.

SHI, P.; LIN, X.; YAO, H. A comprehensive review of recent studies on pharmacokinetics of traditional Chinese medicines (2014-2017) and perspectives. **Drug Metab Rev**, v. 50, n. 2, p. 161-92, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29258334> >.

SHITARA, Y. et al. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. **Biopharm Drug Dispos**, v. 34, n. 1, p. 45-78, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23115084> >.

SHU, Y. et al. Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5902-7, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719534> >.

SILVA, R. et al. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. **Pharmacol Ther**, v. 149, p. 1-123, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25435018> >.

SILVEIRA, P. F. D.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev Bras Farmacogn**. 18: 9 p. 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400021 >.

SONG, M. et al. Selective inhibition of the cytochrome P450 isoform by hyperoside and its potent inhibition of CYP2D6. **Food Chem Toxicol**, v. 59, p. 549-53, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835282> >.

STAUD, F.; PAVEK, P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 4, p. 720-5, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15694832> >.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento** Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 1, p.1-10.

STROBL, G. R. et al. Development of a pharmacophore for inhibition of human liver cytochrome P-450 2D6: molecular modeling and inhibition studies. **J Med Chem**, v. 36, n. 9, p. 1136-45, 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8487254> >.

TAMAI, I. Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 6, p. 508-14, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824501> >.

TESTA, B.; CLEMENT, B. Biotransformation Reactions and their Enzymes. In: WERMUTH, C. G.;ALDOUS, D., et al (Ed.). **The Practice of Medicinal Chemistry**. 4. London: Elsevier, 2015. cap. 24, 904 p.

THOMSON, P. et al. Factors influencing the use of complementary and alternative medicine and whether patients inform their primary care physician. **Complement Ther Med**, v. 20, n. 1-2, p. 45-53, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305248> >.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 336 p.

TSUJIMOTO, M. et al. Inhibitory Effects of Vegetable Juices on CYP3A4 Activity in Recombinant CYP3A4 and LS180 Cells. **Biol Pharm Bull**, v. 39, n. 9, p. 1482-7, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27582329> >.

TURNER, J. R. et al. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. **Semin Cell Dev Biol**, v. 36, p. 204-12, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25263012> >.

UEDA, K.; TAGUCHI, Y.; MORISHIMA, M. How does P-glycoprotein recognize its substrates? **Semin Cancer Biol**, v. 8, n. 3, p. 151-9, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9441945> >.

UNG, C. O. L.; HARNETT, J.; HU, H. Development of a strategic model for integrating complementary medicines into professional pharmacy practice. **Res Social Adm Pharm**, v. 14, n. 7, p. 663-72, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28784591> >.

UNIPROT. 2015. Disponível em: < <http://www.uniprot.org/> >.

VARMA, M. V. et al. pH-sensitive interaction of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) with organic anion transporting polypeptide 2B1. **Mol Pharm**, v. 8, n. 4, p. 1303-13, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21710988> >.

VIEIRA, R. D. C. F. **Estudo do uso de plantas medicinais e/ou produtos à base de plantas medicinais como tratamento complementar, por pacientes atendidos no Centro de Pesquisas Oncológicas – CEPON/SC**. 2008. 176 (Mestrado). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/91763> >.

VRZAL, R. Anthocyanidins but not anthocyanins inhibit P-glycoprotein-mediated calcein extrusion - possible implication for orally administered drugs. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 30, n. 3, p.

248-52, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26821071> >.

WALSH, D. R.; NOLIN, T. D.; FRIEDMAN, P. A. Drug Transporters and Na⁺/H⁺ Exchange Regulatory Factor PSD-95/Drosophila Discs Large/ZO-1 Proteins. **Pharmacol Rev**, v. 67, n. 3, p. 656-80, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092975> >.

WANG, Y. M. et al. Piperine activates human pregnane X receptor to induce the expression of cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 272, n. 1, p. 96-107, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707768> >.

WEBER, C. C. et al. Modulation of P-glycoprotein function by St John's wort extract and its major constituents. **Pharmacopsychiatry**, v. 37, n. 6, p. 292-8, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15551196> >.

WELZ, A. N.; EMBERGER-KLEIN, A.; MENRAD, K. Why people use herbal medicine: insights from a focus-group study in Germany. **BMC Complement Altern Med**, v. 18, n. 1, p. 9, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29544493> >.

WHO (World Health Organization). **WHO traditional medicine strategy: 2014-2023**: World Health Organization 2013. 76 p. Disponível em: < http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy_14_23/en/ >.

WILLIAMS, J. A. et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. **Drug Metab Dispos**, v. 32, n. 11, p. 1201-8, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304429> >.

WILLIAMSON, E.; DRIVER, S.; BAXTER, K. **Stockley's Herbal Medicines Interactions**. London: Pharmaceutical Press, 2009. 423 p.

WILLIAMSON, E.; DRIVER, S.; BAXTER, K. **Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. Porto Alegre: Artmed, 2012. 440 p.

WILLSON, T. M.; KLIEWER, S. A. PXR, CAR and drug metabolism. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 4, p. 259-66, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12120277> >.

WOLKING, S. et al. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. **Clin Pharmacokinet**, v. 54, n. 7, p. 709-35, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25860377> >.

XIE, F.; DING, X.; ZHANG, Q. Y. An update on the role of intestinal cytochrome P450 enzymes in drug disposition. **Acta Pharm Sin B**, v. 6, n. 5, p. 374-83, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27709006> >.

YANG, L.; SIBBRITT, D.; ADAMS, J. A critical review of complementary and alternative medicine use among people with arthritis: a focus upon prevalence, cost, user profiles, motivation, decision-making, perceived benefits and communication. **Rheumatol Int**, 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889825> >.

YANG, Y. et al. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. **Fitoterapia**, v. 92, p. 133-47, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24177191> >.

YAO, J. et al. N-Glycosylation dictates proper processing of organic anion transporting polypeptide 1B1. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. 8, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285087> >.

YE, L. H. et al. Lotus leaf alkaloid fraction can strongly inhibit CYP2D6 isoenzyme activity. **J Ethnopharmacol**, v. 194, p. 913-17, Dec 24 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27771456> >.

YOU, B. H. et al. *Houttuynia cordata* extract increased systemic exposure and liver concentrations of metformin through OCTs and MATEs in rats. **Phytother Res**, v. 32, n. 6, p. 1004-13, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29480578> >.

YU, J. et al. Intestinal Drug Interactions Mediated by OATPs: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Findings. **J Pharm Sci**, v. 106, n. 9, p. 2312-25, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28414144> >.

ZACHARIAE, R. Complementary and Alternative Medicine Use Among Patients With Cancer: A Challenge in the Oncologist-Patient Relationship. **JAMA Oncol**, v. 2, n. 9, p. 1177-8, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27243213> >.

ZAKERI-MILANI, P.; VALIZADEH, H. Intestinal transporters: enhanced absorption through P-glycoprotein-related drug interactions. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 10, n. 6, p. 859-71, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24708201> >.

ZHANG, J. et al. The safety of herbal medicine: from prejudice to evidence. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 3, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838831> >.

ZHANG, X. L. et al. Therapeutic Risk and Benefits of Concomitantly Using Herbal Medicines and Conventional Medicines: From the Perspectives of Evidence Based on Randomized Controlled Trials and Clinical Risk Management. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2017, p. 17, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28491115> >.

ZHOU, S. F.; LIU, J. P.; LAI, X. S. Substrate specificity, inhibitors and regulation of human cytochrome P450 2D6 and implications in drug development. **Curr Med Chem**, v. 16, n. 21, p. 2661-805, 2009. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19601803> >.

ZHU, C. et al. Evolutionary Analysis and Classification of OATs, OCTs, OCTNs, and Other SLC22 Transporters: Structure-Function Implications and Analysis of Sequence Motifs. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. 20, 2015. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26536134> >.

CAPÍTULO II

**PERFIS CROMATOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DAS PLANTAS
MEDICINAIS EM ESTUDO**

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste Capítulo são apresentados os perfis cromatográficos e a citotoxicidade dos extratos em estudo frente às células Caco-2. Os perfis qualitativos foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao ultravioleta (CLAE-UV), e a citotoxicidade foi avaliada utilizando-se o método colorimétrico com sulforrodamina B.

A citotoxicidade dos fármacos, usados nas demais metodologias empregadas neste trabalho envolvendo as células Caco-2, também foi analisada e esses dados são apresentados no presente Capítulo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Extratos e fármacos

Os extratos secos das plantas medicinais *Cynara scolymus*; *Camellia sinensis*; *Echinacea* sp.; *Cimicifuga racemosa*; *Ginkgo biloba* e *Glycine max* foram adquiridos da Vita Essência Farmácia de Manipulação (Florianópolis, SC, Brasil); o extrato de *Matricaria recutita* foi fornecido pela Farmácia de Manipulação VitalFarm (Florianópolis, SC, Brasil); e os extratos de *Cecropia glaziovii*, *Ilex paraguariensis* e *Bauhinia forficata* foram fornecidos pelo Professor Flávio Henrique Reginatto (Laboratório de Farmacognosia, CIF, CCS, UFSC). Dados sobre os extratos/plantas medicinais estão resumidos no Quadro II.1.

Os fármacos quinidina, sulfassalazina e rifampicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Quadro II. 1 - Informações sobre as plantas medicinais selecionadas para o estudo.

Planta medicinal *	Código	Nome popular	Família	Fornecedor	Informações***
<i>Cynara scolymus</i> L.	CSc	Alcachofra	Asteraceae	Vita Essência	Ácido clorogênico > 0,5%
<i>Matricaria recutita</i> L.	MR	Camomila	Asteraceae	VitalFarm	Flavonoides = 0,16%
<i>Camellia sinensis</i> (L. Kuntze.	CSi	Chá-verde	Theaceae	Vita Essência	Catequinas > 30%
<i>Cecropia glaziovii</i> Sneth. #	CG	Embaúba	Urticaceae	Lab. de Farmacognosia	Ácido clorogênico ~ 0,11%
<i>Echinacea</i> sp.	EQ	Equinácea	Asteraceae	Vita Essência	Taninos > 1,5%
<i>Cimicifuga racemosa</i> L.	CR	Erva-de-são-cristóvão	Ranunculaceae	Vita Essência	Glicosídeos triterpênicos > 0,5%
<i>Ilex paraguariensis</i> A St.-Hil. #	IP	Eva-mate **	Aquifoliaceae	Lab. De Farmacognosia	Ácido clorogênico = 6,75%
<i>Ginkgo biloba</i> L.	GB	Ginco **	Ginkgoaceae	Vita Essência	Glicosídeos flavonoides > 25%
<i>Bauhinia forficata</i> Linl	BF	Pata-de-vaca	Fabaceae	Lab. de Farmacognosia	Sem dados publicados
<i>Glycine max</i> (L.) Merl	GM	Soja	Fabaceae	Vita Essência	Isoflavonas > 40%

Todos são extratos aquosos. *Extratos secos padronizados em conformidade com os requisitos analíticos. **Extrato hidroalcolico. *** Informações obtidas nos laudos ou # artigos publicados pelos fornecedores dos extratos (BLUM-SILVA et al., 2016; COSTA et al., 2011; LUZ et al., 2016).

2.2 Preparação dos extratos e fármacos para as análises cromatográficas e testes de citotoxicidade em células Caco-2

Os extratos utilizados para análise cromatográfica foram solubilizados em metanol grau HPLC (Merck) na concentração de 10 mg/mL ou 0,5 mg/mL e as soluções foram sonicadas e centrifugadas por 10 min a 8400 x *g*. Posteriormente, 10 µL de cada extrato foram injetados no cromatógrafo.

Para os ensaios de citotoxicidade, as soluções-estoque dos extratos foram preparadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) contendo 4,5 g/L de glicose e 1% de PS (10.000 U de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina, Cultilab) na concentração inicial de 2 mg/mL e filtradas assepticamente em membrana de 0,22 µm.

As soluções-estoque dos fármacos foram preparadas por solubilização em DMSO (Dimetilsulfóxido, Merck, > 99%) para obter concentrações de 100 ou 5 mM, dependendo das características de solubilidade de cada fármaco. A concentração final de DMSO aplicada nas células durante os experimentos foi menor que 1%.

2.3 Perfis cromatográficos dos extratos obtidos por CLAE-UV

Para a análise dos perfis cromatográficos dos extratos foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters), equipado com injetor automático 2695, detector de arranjos diodos (DAD) 2996, bomba L-6200A, integrador C-R4A e programa Empower para processamento de dados. Para tal foi usada uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm) (Merck) acoplada a uma pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 x 4 mm, 5 µm) (Merck). Como fase móvel, empregou-se ácido fosfórico 0,1% (Fluka Analytical) e acetonitrila grau HPLC (Merck). A separação foi efetuada utilizando-se um gradiente linear de 5-95% de acetonitrila durante 60 min, com manutenção a 95% de acetonitrila por 5 min e reequilíbrio da coluna por 5 min, com total de 70 min de tempo de corrida. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e a temperatura da coluna mantida a 40°C. A detecção no UV foi efetuada nos comprimentos de onda (λ) de 210 ou 220, 280 e 350 nm.

Foram selecionados para análise os picos cromatográficos com áreas relativas superiores a 4% e espectros definidos, ou picos com áreas menores que 4%, mas que possuíam espectros característicos e sugestivos de uma determinada classe de compostos.

2.4 Cultura de células Caco-2

As células Caco-2, células de adenocarcinoma de cólon humano (#HTB-37), obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), foram mantidas em DMEM contendo 4,5 g/L de glicose (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 1% de L- glutamina (Cultilab) e de aminoácidos não essenciais (Cultilab). As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida (referidas no decorrer deste trabalho como “condições padrão de cultivo”) até atingirem a confluência de, no máximo, 80-90% para subcultivo e uso nos testes de citotoxicidade. A avaliação da qualidade desta linhagem celular foi rotineiramente testada, incluindo testes para detecção da presença de bactérias, fungos e leveduras e micoplasmas, tendo sido todos os testes negativos.

2.5 Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2

A citotoxicidade dos extratos selecionados e dos fármacos foi determinada pelo método colorimétrico utilizando sulforrodamina B, conforme descrito por Vichai e Kirtikara (2006) com algumas modificações. Essa metodologia é baseada na capacidade de ligação do corante ao conteúdo proteico celular, permitindo a determinação da viabilidade celular de forma indireta pela quantificação de proteínas totais.

As células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 cavidades, na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/cavidade, 48 h anteriormente ao tratamento com as amostras. As células foram tratadas com os fármacos (quinidina, sulfassalazina ou rifampicina), na concentração inicial de 100 µM ou 200 µM, ou com os extratos das plantas selecionadas. Os extratos foram testados em seis concentrações, obtidas por diluição seriada (1:2 v/v), a partir de soluções a 1 mg/mL. As placas foram incubadas nas condições padrão de cultivo durante a manutenção e o tratamento. Os tratamentos foram aplicados por 6, 24 ou 48 h e ao controle celular foi adicionado apenas DMEM contendo 4,5 g/L de glicose.

Finalizada a incubação, as células foram fixadas por 1 h a 4°C com ácido tricloroacético 10% (TCA, LAFAN Química Fina), lavadas com água destilada, secas e coradas com 100 µL da solução de sulforrodamina B (0,057%, Sigma-Aldrich) em ácido acético 1% (LAFAN Química Fina), por 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com ácido acético 1% para remoção do corante não ligado, secas, e o corante solubilizado com 100 µL da solução de Tris Base 10 mM (pH 10,5, Sigma-Aldrich). A leitura das absorbâncias foi efetuada em espectrofotômetro SoftMax® Pro - Molecular Devices em 510 nm e os dados analisados usando o programa GraphPad Prism 5.

2.6 Análise estatística

Os dados de citotoxicidade foram analisados com os programas Microsoft Excel® 2016 e GraphPad Prism V.5. utilizando regressão linear e ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Sidak, com intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil exploratório dos extratos

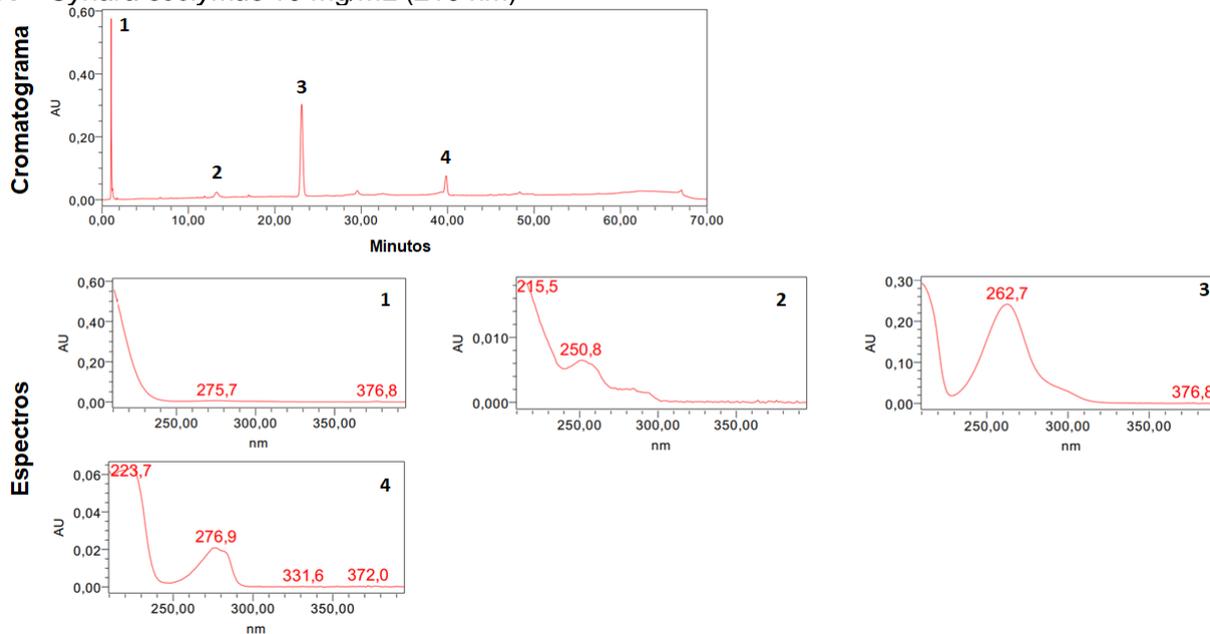
Todos os extratos padronizados, incluindo os comerciais, que vieram acompanhados por laudos que garantiam sua conformidade com os requisitos analíticos, foram analisados por CLAE-UV para confirmação e reconhecimento dos seus principais constituintes.

A seguir, serão apresentados os cromatogramas e os espectros no UV dos extratos analisados. Os picos cromatográficos e os espectros foram numerados para verificação da correspondência e podem ser visualizados na Figura II. 1.

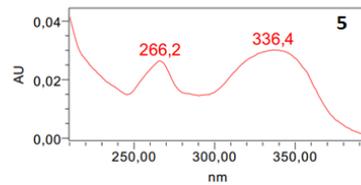
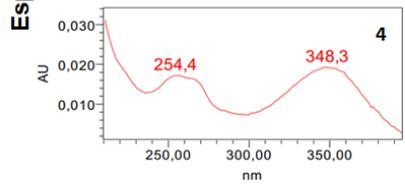
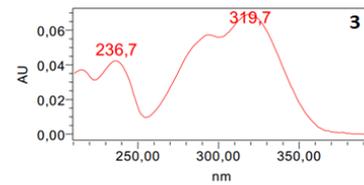
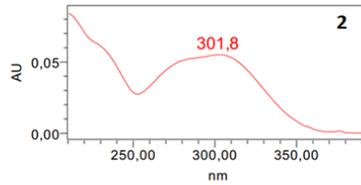
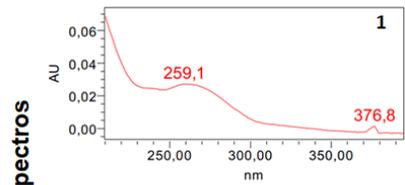
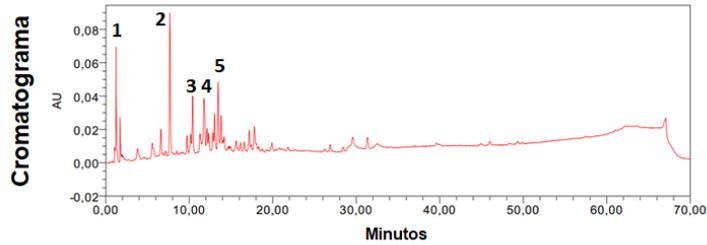
Como pode ser observado na maioria dos cromatogramas, os constituintes dos extratos possuem características bastante polares, tendo sido eluídos logo no início da corrida cromatográfica, onde são separados os compostos de maior polaridade de acordo com as condições cromatográficas aplicadas.

Figura II. 1 - Perfis cromatográficos e espectros no UV dos compostos majoritários detectados nos extratos das plantas medicinais selecionadas para este estudo.

A – *Cynara scolymus* 10 mg/mL (210 nm)

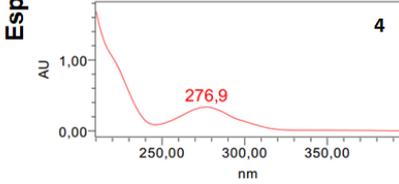
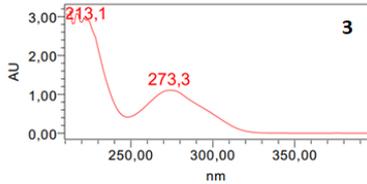
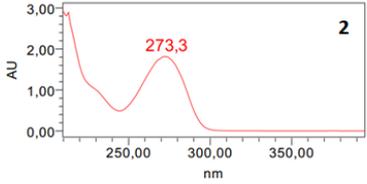
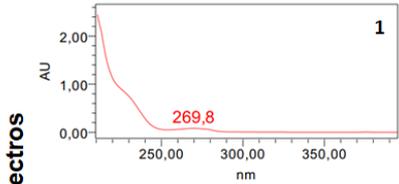
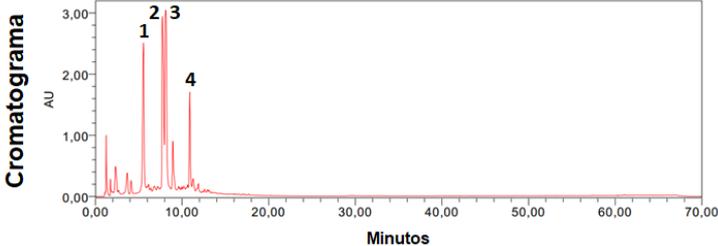


B – *Matricaria recutita* 10 mg/mL (210 nm)

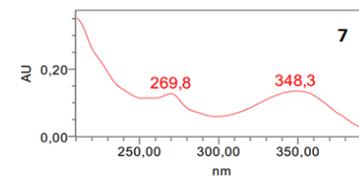
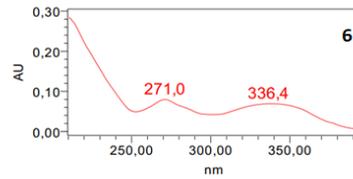
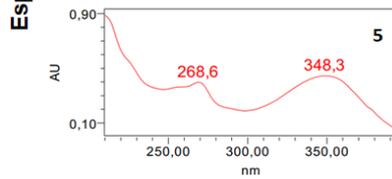
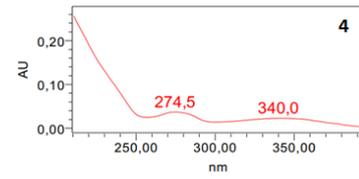
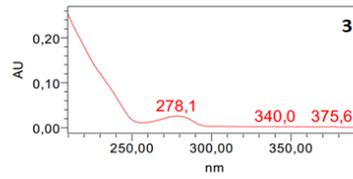
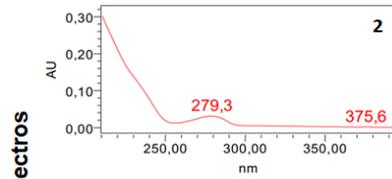
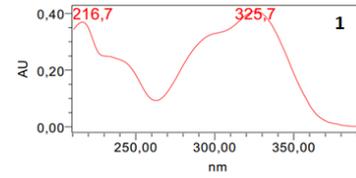
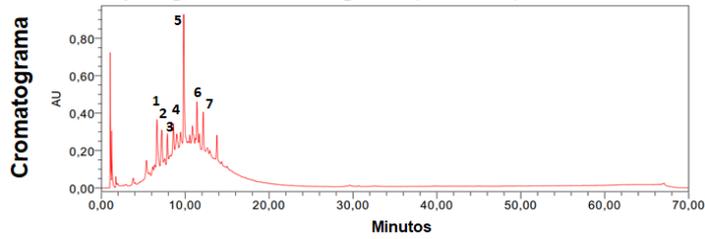


Espectros

C – *Camellia sinensis* 10 mg/mL (210 nm)

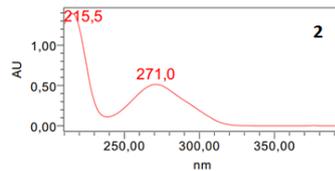
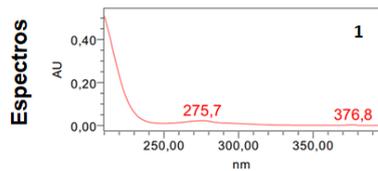
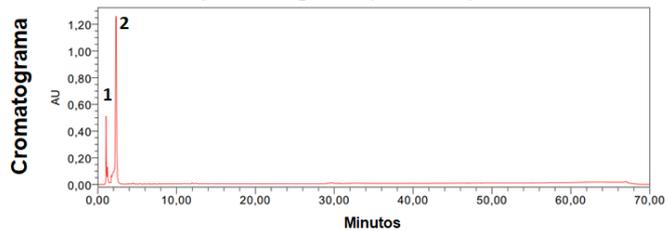


D – *Cecropia glaziovii* 10 mg/mL (210 nm)

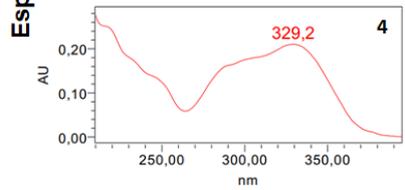
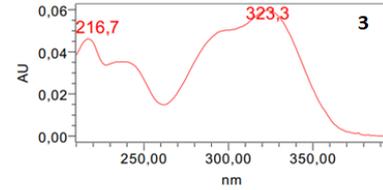
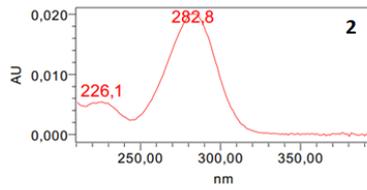
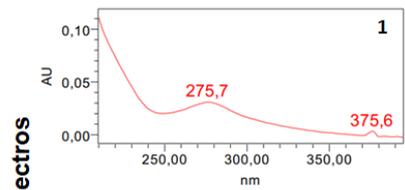
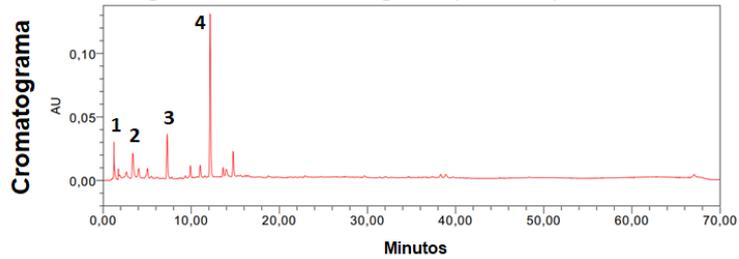


Espectros

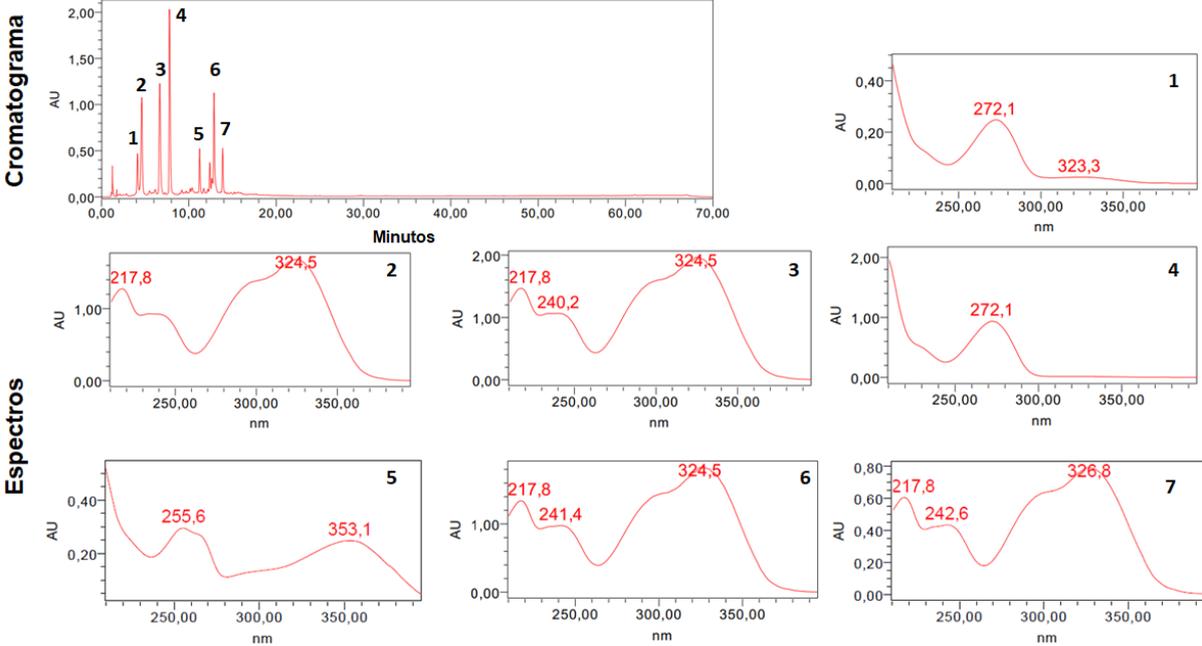
E – Echinacea sp. 10 mg/mL (210 nm)



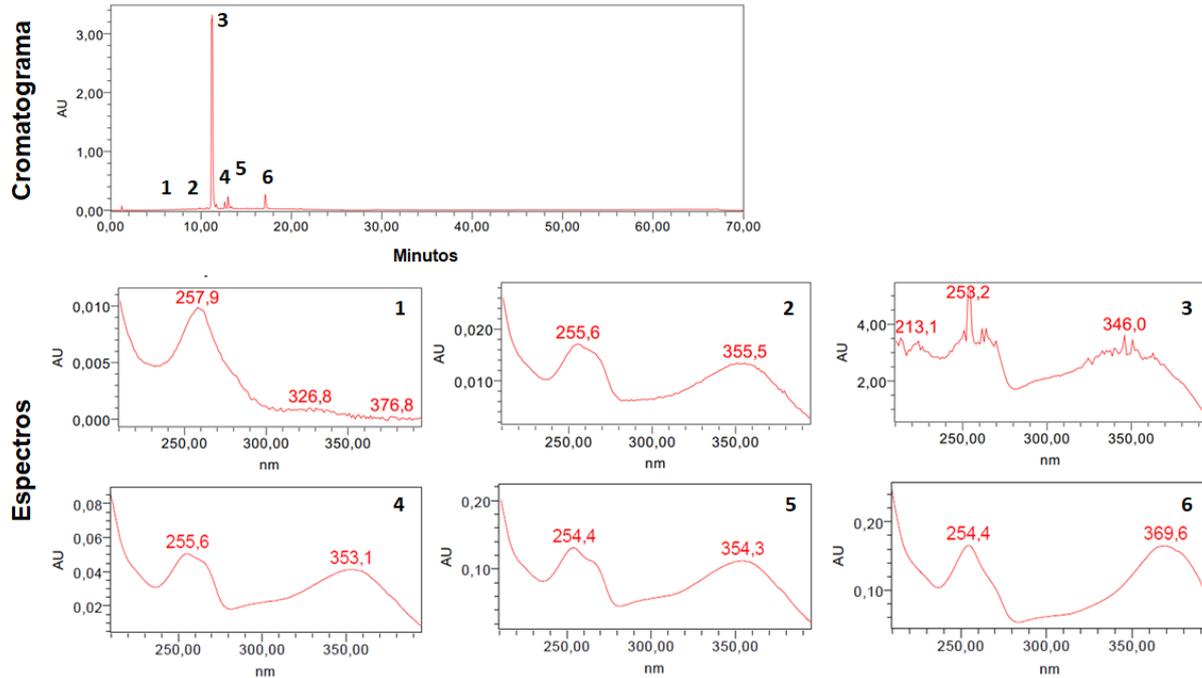
F – *Cimicifuga racemosa* 10 mg/mL (280 nm)



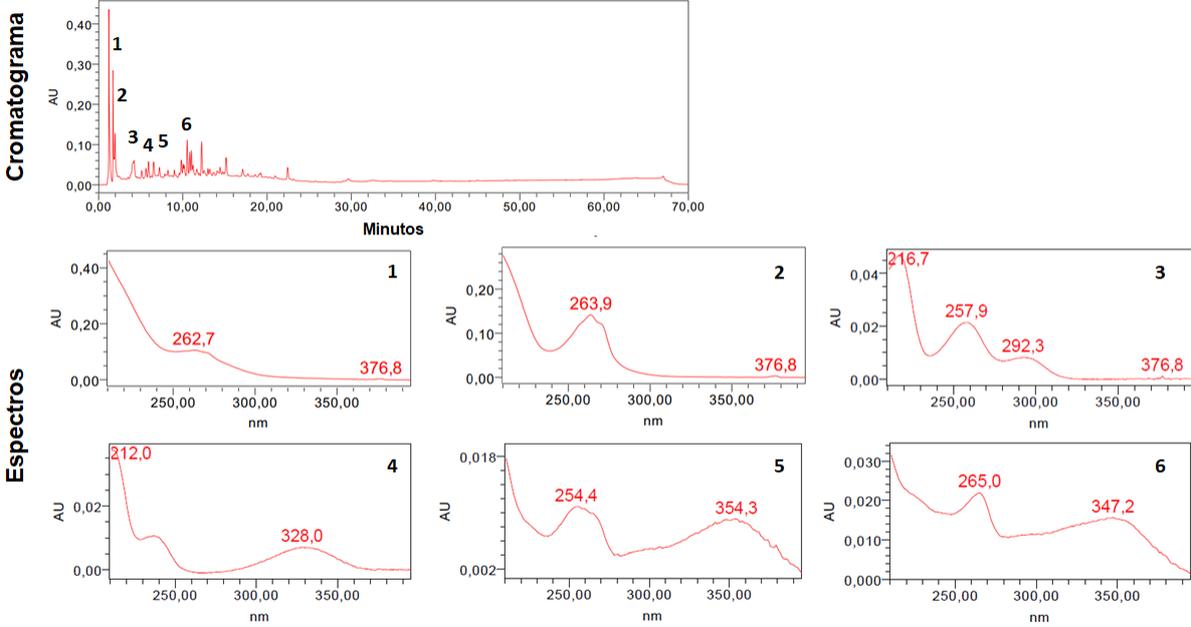
G – *Ilex paraguariensis* 10 mg/mL (210 nm)



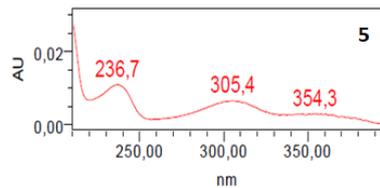
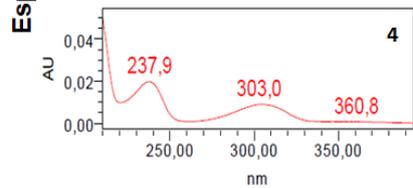
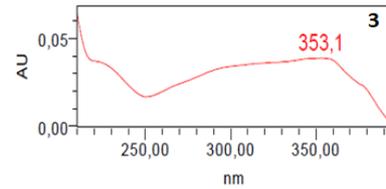
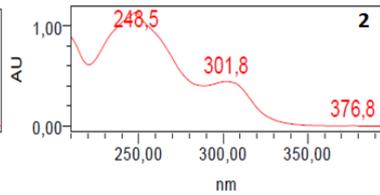
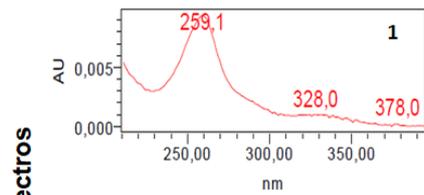
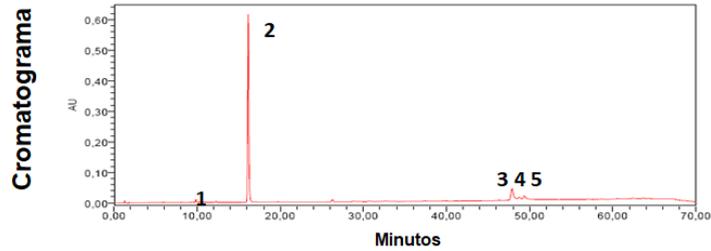
H – *Ginkgo biloba* 10 mg/mL (210 nm)



I – *Bauhinia forficata* 10 mg/mL (210 nm)



J – *Glycine max* 0,5 mg/mL (220 nm)



Com base nos dados dos cromatogramas e dos espectros, foram sugeridas as possíveis classes/compostos constituintes majoritários de cada extrato (Quadro II.2). A sugestão foi efetuada com base no banco de dados Reaxys (Elsevier) e em dados já publicados por comparação dos espectros e dos máximos de absorção obtidos com os descritos na literatura.

Quadro II. 2 - Sugestão dos compostos presentes nos extratos em estudo de acordo com o perfil dos espectros cromatográficos no UV.

Planta/Extrato	Características	Pico	Espectros sugestivos de
<i>Cynara scolymus</i> (alcachofra)	Rica em compostos fenólicos, aos quais são conferidas muitas de suas propriedades terapêuticas (ABU-REIDAH et al., 2013). Contém fenilpropanoides, saponinas, flavonoides, sesquiterpenos e esteroides (BRASIL, 2016).	1	Derivados do ácido cafeico (HAUSLER et al., 2002).
		2	Flavonoides, tal como a luteolina-7-rutinosídeo (WANG et al., 2003).
		3	Ácidos fenólicos simples (WANG et al., 2003).
		4	Antocianinas (SCHUTZ et al., 2006; ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTI, 2017).
<i>Matricaria recutita</i> (camomila)	Tem como constituintes diversos compostos fenólicos, em especial ácidos fenólicos e flavonoides (JABRI et al., 2017), cumarinas e óleo volátil rico em farneseno e alfa-bisabolol (BRASIL, 2016).	1	Compostos fenólicos, tal como o ácido cafeico (SINGH et al., 2011).
		2	Cumarinas, tais como os derivados do ácido metoxicinâmico (PETRULOVA-PORACKA et al., 2013).
		3	Ácido ferúlico (MINCSOVICS et al., 2013).
		4 e 5	Flavonoides, tais como luteolina (4) e apigenina (5) (SINGH et al., 2011).

<i>Camellia sinensis</i> (chá-verde)	Rica em polifenóis, taninos e metilxantinas (RATES, 2017).	1	Metilxantinas , tal como a cafeína (RATES, 2017).*
		2, 3 e 4	Catequinas (ATOMSSA; GHOLAP, 2015).*
<i>Cecropia glaziovii</i> (embaúba)	Os principais metabólitos secundários do gênero <i>Cecropia</i> são compostos fenólicos, tais como C-glicosilflavonoides e proantocianidinas (COSTA et al., 2011).	1	Ácidos fenólicos, como o ácido cafeoilquínico (BERINGHS et al., 2015). *#
		2, 3 e 4	Catequinas (PIRES et al., 2017). *#
		5, 6 e 7	Flavonoides, como luteolina-8-C-glicosídeo (5), isovitexina (6) e acetilvitexina (7) (AMAT et al., 2009; ZUANAZZI et al., 2017).*#
<i>Echinacea</i> sp. (Equinácea)	Apresenta fitoconstituintes como alquilamidas, polissacarídeos, derivados do ácido cafeico, fenilpropanoides e sesquiterpenos (BRASIL, 2016).	1 e 2	Compostos fenólicos derivados do ácido cafeico (1) e de compostos como o ácido chicórico ou ácido caftárico (2) (DU et al., 2017; ERENLER et al., 2015; MANCEK; KREFT, 2005). No perfil exploratório desse extrato foram detectados 21 picos cromatográficos, tendo sido analisados apenas os dois majoritários. Os espectros dos demais picos obtidos foram, na sua maioria, sugestivos de ácidos fenólicos.
<i>Cimicifuga racemosa</i> (erva-de-são-cristóvão)	Fazem parte da composição da <i>Cimicifuga racemosa</i> compostos da classe dos glicosídeos triterpênicos, além de derivados fenólicos,	1	Derivados do ácido cafeico (GUO et al., 2017; LI et al., 2003).
		2	Glicosídeos triterpênicos (JIANG et al., 2006).

	saponinas, flavonoides, lignanas, e taninos (BRASIL, 2016; GUO et al., 2017).	3	Compostos fenólicos, tais como o ácido cimicifúgico ou o ácido fukinolico (JIANG et al., 2006).
		4	Ácido rosmarínico (GODECKE et al., 2009).
<i>Ilex paraguariensis</i> (erva-mate)	Composta majoritariamente por constituintes fenólicos, como os derivados do ácido cafeico, e por metilxantinas, como cafeína e teobromina (BLUM-SILVA et al., 2016).	1 e 4	Metilxantinas (RATES, 2017). [#]
		2, 3, 6 e 7	Derivados do ácido cafeico (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). [#]
		5	Flavonoides, tal como a rutina (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007).
<i>Ginkgo biloba</i> (ginco)	Os constituintes mais abundantes no <i>Ginkgo biloba</i> são os flavonoides, presentes tanto na forma livre como glicosilada, as terpenolactonas e os ácidos fenólicos (BRASIL, 2016; JI et al., 2017).	1	Terpenos, tais como os gincolídeos ou bilobalida (ZUANAZZI et al., 2017).
		2, 3, 4, 5 e 6	Flavonoides, tais como rutina (2 e 4), luteolina (3), canferol (5) e quercetina (6) (DING et al., 2008; JI et al., 2017; ZUANAZZI et al., 2017). Foram detectados neste extrato 41 picos cromatográficos, sendo o pico 3 o mais intenso. A má resolução do espectro 3 pode ser devida à alta concentração deste constituinte no extrato analisado.
<i>Bauhinia forficata</i> (pata-de-vaca)	As plantas do gênero <i>Bauhinia</i> são ricas em flavonoides, seus principais constituintes (FARAG et al., 2015).	1	Derivados do ácido benzoico (MARQUES et al., 2012).
		2	Proantocianidinas (MARQUES et al., 2012).
		4	Triterpenos (MARQUES et al., 2012).
		5 e 6	Flavonoides (MARQUES et al., 2012).
<i>Glycine max</i> (soja)	Contém, principalmente, flavonoides, carotenoides, saponinas, antocianinas	1 e 2	Isoflavonas (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2003).

e isoflavonas (BRASIL, 2016). Os compostos desta planta que possuem grande importância terapêutica são as isoflavonas, tais como genisteína e daidzeína, com atividade estrogênica (AHMAD et al., 2014; DIETZ et al., 2016).

4 e 5 Antocianinas (BRASIL, 2016).

Os perfis químicos dos extratos analisados permitiram verificar que os mesmos apresentam espectros característicos das classes de compostos tipicamente encontradas nas plantas que os originaram. Além de contribuir para a confirmação da identidade das amostras utilizadas, a análise exploratória, juntamente com os dados da literatura, propiciou inferir a presença dos principais compostos nos extratos em estudo. A identificação dos fitoconstituintes é muito útil para o estabelecimento das relações entre a composição química e as bioatividades das plantas medicinais em estudo e, neste trabalho em especial, para relacionar com os dados de função e expressão obtidos e apresentados nos capítulos seguintes.

3.2 Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2

3.2.1 Citotoxicidade dos extratos frente as células Caco-2

A citotoxicidade dos extratos das plantas medicinais selecionadas foi avaliada em três diferentes tempos de incubação. Primeiramente, as células foram tratadas por 6 h, tempo aproximado de exposição das células Caco-2 aos extratos nos ensaios de transporte bidirecional (Capítulo III). Posteriormente, foram testados os tempos de 24 h e 48 h para a escolha da concentração ideal de cada extrato para uso nos ensaios de modulação dos sistemas repórteres e de expressão gênica e proteica (Capítulos V e VI).

Os extratos foram testados a partir da concentração de 1 mg/mL e os resultados estão dispostos nas Figuras II. 2, II. 3 e II. 4.

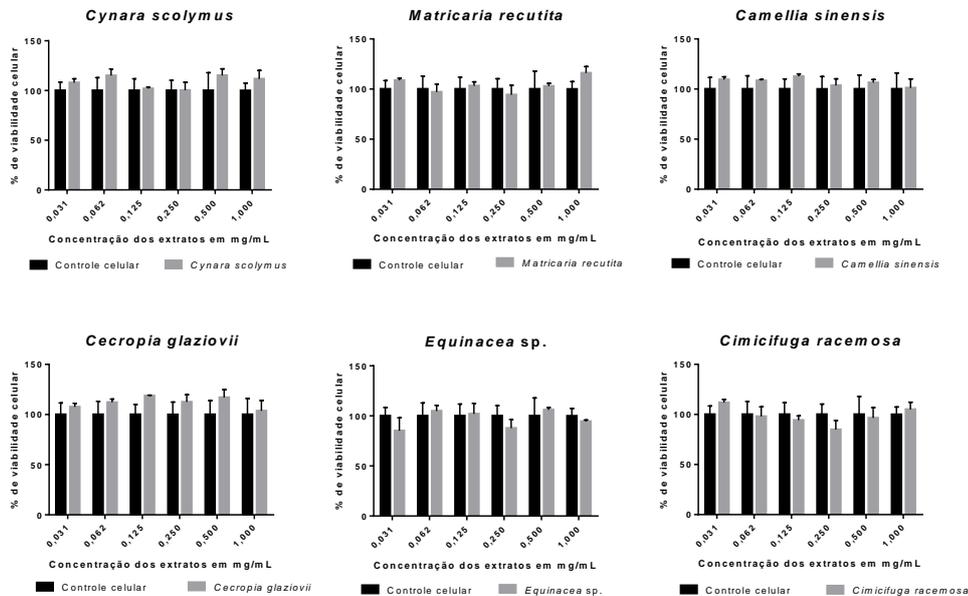
Não foram constatadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os controles celulares e as células tratadas com os diferentes extratos, bem como entre as concentrações dos extratos utilizadas para o tratamento das células por 6 h e 24 h. Entretanto, foram verificadas diferenças significativas entre as amostras dos extratos GB ($p < 0,001$); GM ($p < 0,001$); MR ($p < 0,001$); IP ($p < 0,001$); CSi ($p < 0,0001$); CG ($p < 0,0001$) e BF ($p < 0,05$) após 48 h de incubação com os extratos.

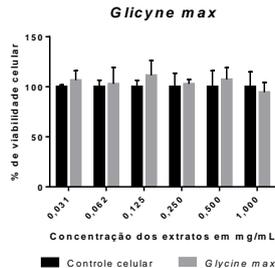
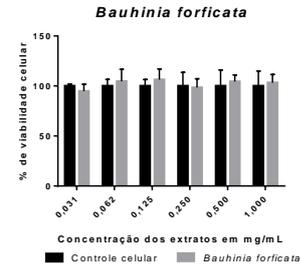
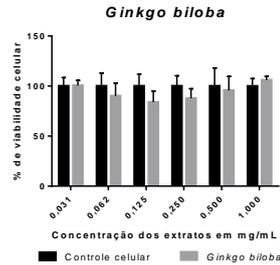
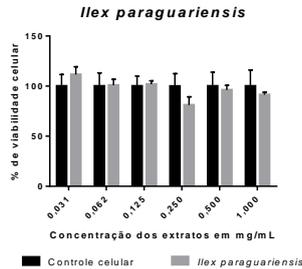
Sendo assim, pode-se concluir que concentrações de até 1 mg/mL dos extratos selecionados podem ser utilizadas para o tratamento das células Caco-2 durante 6 h ou 24 h, sem comprometimento da viabilidade celular. Os extratos que apresentaram citotoxicidade para as células Caco-2 em incubações por 48 h tiveram as concentrações de tratamento ajustadas para concentrações não citotóxicas. A Tabela II. 1 apresenta as concentrações dos extratos que reduzem a viabilidade celular em 10%. As concentrações foram calculadas por análise de regressão linear.

Tabela II. 1 - Citotoxicidade dos extratos em células Caco-2, após incubação por 6 h, 24 h e 48 h.

Tempo de incubação	6 h	24 h	48 h
Planta medicinal	Concentração (µg/mL) que reduz a viabilidade celular em 10%		
<i>Cynara scolymus</i>	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Matricaria recutita</i>	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Camellia sinensis</i>	> 1000	> 1000	312,5
<i>Cecropia glaziovii</i>	> 1000	> 1000	145,8
<i>Echinacea</i> sp.	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Cimicifuga racemosa</i>	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Ilex paraguariensis</i>	> 1000	> 1000	203,6
<i>Ginkgo biloba</i>	> 1000	> 1000	> 1000
<i>Bauhinia forficata</i>	> 1000	> 1000	451,2
<i>Glycine max</i>	> 1000	> 1000	> 1000

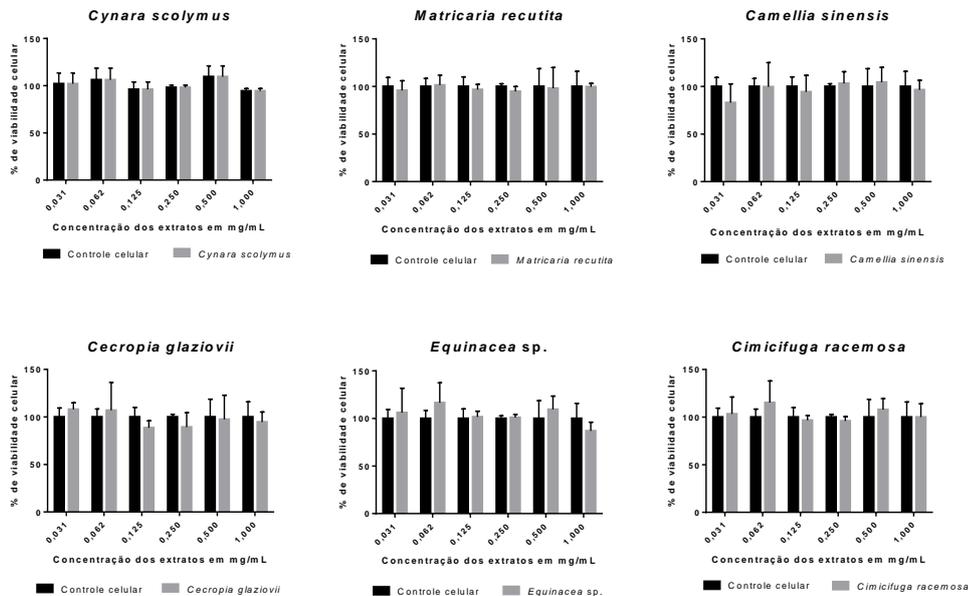
Figura II. 2 - Citotoxicidade dos extratos em células Caco-2 após 6 h de tratamento.

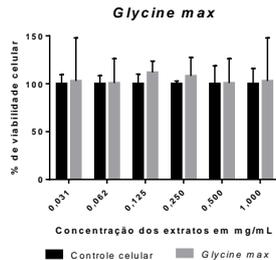
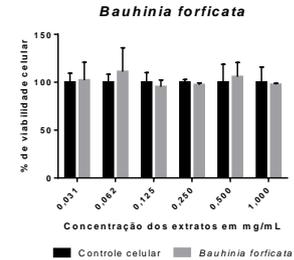
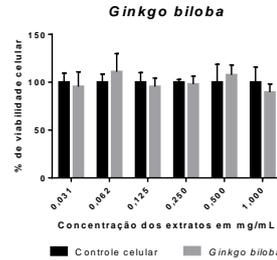
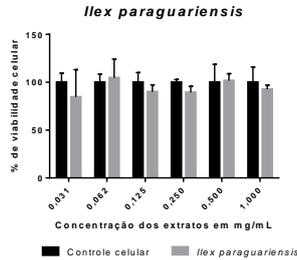




Dados expressos em concentração (mg/mL) versus viabilidade celular (%). Os dados correspondem a três experimentos independentes e foram analisados por ANOVA duas vias com intervalo de confiança de 95%. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na % de viabilidade celular entre os controles celulares e as células tratadas nem entre as concentrações dos extratos testadas.

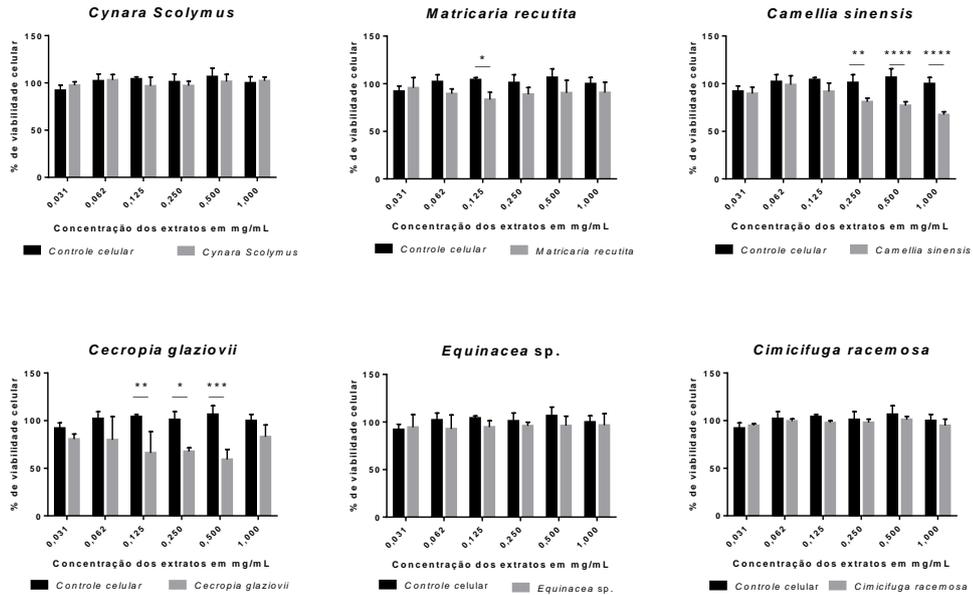
Figura II. 3 - Citotoxicidade dos extratos em células Caco-2 após 24 h de tratamento.

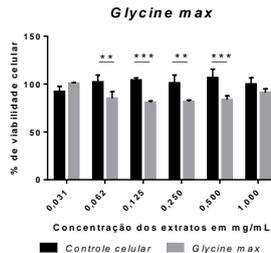
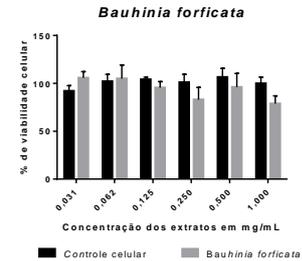
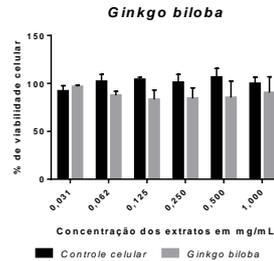
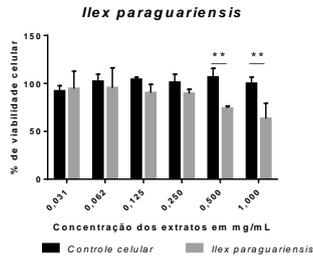




Dados expressos em concentração (mg/mL) versus viabilidade celular (%). Os dados correspondem a três experimentos independentes e foram analisados por ANOVA duas vias com intervalo de confiança de 95%. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na % de viabilidade celular entre os controles celulares e as células tratadas nem entre as concentrações dos extratos testadas.

Figura II. 4 - Citotoxicidade dos extratos em células Caco-2 após 48 h de tratamento.





Dados expressos em concentração (mg/mL) versus viabilidade celular (%). Os dados correspondem a três experimentos independentes e foram analisados por ANOVA duas vias com pós-teste de Sidak e intervalo de confiança de 95%. Foram verificadas diferenças significativas na % de viabilidade celular entre as amostras MR *** ($p < 0,001$); CSI **** ($p < 0,0001$); CG **** ($p < 0,0001$); IP *** ($p < 0,001$); GB *** ($p < 0,001$); BF * ($p < 0,05$) e GM *** ($p < 0,001$). As diferenças significativas entre os tratamentos e os respectivos controles estão indicadas nos gráficos.

3.2.2 Citotoxicidade dos fármacos frente às células Caco-2

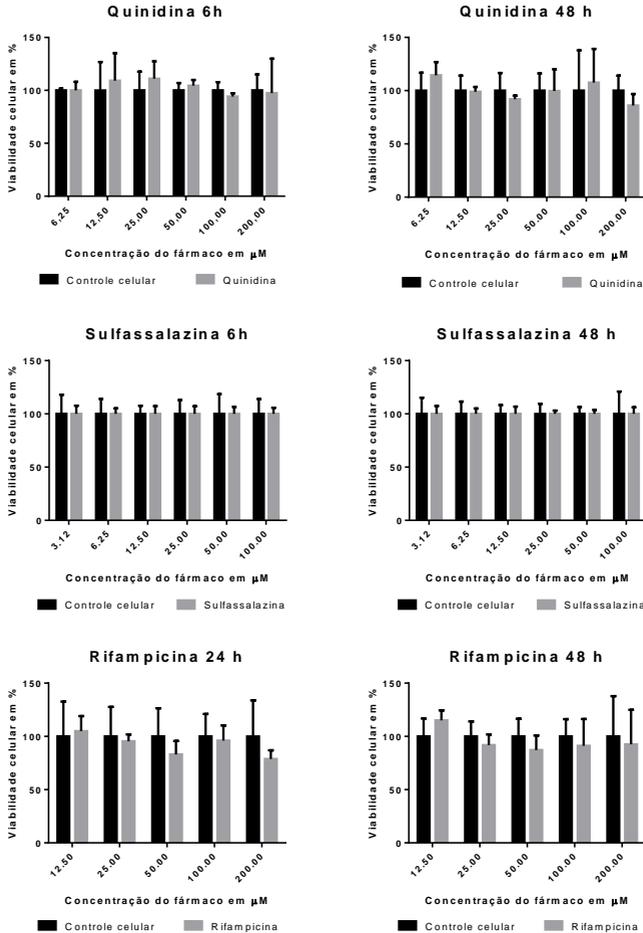
Alguns fármacos são recomendados por órgãos reguladores para realização de estudos *in vitro* com enzimas metabólicas e transportadores celulares, por permitirem uma relativa seletividade para o alvo em estudo. Esses fármacos marcadores (substratos, indutores e inibidores) estão disponíveis em uma lista na página eletrônica do FDA. Entre os fármacos listados estão quinidina e sulfassalazina, os quais são substratos da P-gp e da BCRP, respectivamente, e o fármaco verapamil recomendado para uso como inibidor da P-gp. Para os estudos com as enzimas do citocromo P450 é aconselhado o uso da rifampicina, um indutor clássico de algumas dessas enzimas (FDA, 2012).

Nos estudos de permeabilidade intestinal (Capítulo III) foram utilizados os fármacos quinidina e sulfassalazina. A citotoxicidade dos fármacos em células Caco-2 foi testada após o tratamento por 6 h, tempo experimental aproximado dos ensaios de permeabilidade intestinal, e após 48 h, para extrapolação do tempo e avaliação da citotoxicidade dos fármacos. Para as investigações utilizando os sistemas repórteres e expressão gênica em incubações por 24 h e 48 h (Capítulos V e VI), o fármaco rifampicina foi utilizado como controle positivo. Por esse motivo, a citotoxicidade desse fármaco foi avaliada nesses tempos experimentais.

Os resultados obtidos estão dispostos na Figura II. 5. A citotoxicidade do verapamil não foi avaliada, por esse ser um fármaco tradicionalmente utilizado para ensaios com células Caco-2 e reconhecidamente não ser citotóxico para as células na concentração utilizada neste trabalho (KRATZ et al, 2011; PATIL et al., 2011).

Os dados não demonstraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os controles celulares e as células tratadas com os diferentes fármacos. Também não foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações dos fármacos utilizadas ($p > 0,05$). Os dados obtidos indicaram que, nas concentrações testadas, esses fármacos não são citotóxicos para as células Caco-2, mesmo com incubação prolongada (48h), podendo ser utilizados nos diferentes experimentos propostos neste trabalho.

Figura II. 5 - Citotoxicidade dos fármacos quinidina, sulfassalazina e rifampicina, em células Caco-2, após 6 h ou 24 h e 48 h de tratamento.



Dados expressos em concentração (μM) versus viabilidade celular (%). Os dados correspondem a três experimentos independentes e foram analisados por ANOVA duas vias com intervalo de confiança de 95%. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na % de viabilidade celular entre os controles celulares e as células tratadas com

os diferentes fármacos e para nenhuma das concentrações ou tempos de incubação testados.

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste Capítulo permitiram a caracterização dos perfis fitoquímicos e citotóxico dos extratos, trazendo informações relevantes ou essenciais para efetuar os demais experimentos propostos neste trabalho, bem como auxiliar na discussão dos resultados. A partir dos dados de citotoxicidade foi possível ajustar as concentrações dos extratos e fármacos, para os diferentes tempos experimentais empregados, garantindo a não interferência do efeito citotóxico nos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

ABU-REIDAH, I. M. et al. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. **Food Chem**, v. 141, n. 3, p. 2269-77, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870957>>.

AHMAD, A. et al. Mechanisms Involved in the Therapeutic Effects of Soybean (*Glycine Max*). **Int J Food Prop**, v. 17, n. 2014, p. 24, 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942912.2012.714828>>.

AMAT, A. et al. Absorption and emission of the apigenin and luteolin flavonoids: a TDDFT investigation. **J Phys Chem A**, v. 113, n. 52, p. 15118-26, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722543>>.

ATOMSSA, T.; GHOLAP, V. Characterization and determination of catechins in green tea leaves using UV-visible spectrometer **J. Eng. Technol. Res**, v. 7, n. 1, p. 22-31, 2015. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/article/article1421835732_Atomssa%20and%20Gholap.pdf>.

BERINGHS, A. O. et al. Response Surface Methodology IV-Optimal design applied to the performance improvement of an RP-

HPLC-UV method for the quantification of phenolic acids in *Cecropia glaziovii* products. **Rev Bras Farmacogn**, v. 25, n. 2015, p. 513-21, 2015. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v25n5/0102-695X-rbfar-25-05-0513.pdf> >.

BLUM-SILVA, C. H. et al. Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS. **Data Brief**, v. 8, p. 295-9, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27331104> >.

BRASIL. **Memento Fitoterápico : Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016. 115 p.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Res Int**, v. 40, n. 2007, p. 13, 2007. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996906001864> >.

COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* Species. **J Braz Chem Soc**, v. 22, n. 6, p. 1096-102, 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v22n6/a14v22n6.pdf> >.

DIETZ, B. M. et al. Botanicals and Their Bioactive Phytochemicals for Women's Health. **Pharmacol Rev**, v. 68, n. 4, p. 1026-73, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27677719> >.

DING, S. et al. Fingerprint profile of *Ginkgo biloba* nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. **Phytochemistry**, v. 69, n. 7, p. 1555-64, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18342344> >.

DU, Y. et al. Simultaneous Determination of Seven Phenolic Acids in Rat Plasma Using UHPLC-ESI-MS/MS after Oral Administration of *Echinacea purpurea* Extract. **Molecules**, v. 22, n. 9, 2017.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28880243> >.

ERENLER, R. et al. Chemical constituents, quantitative analysis and antioxidant activities of *Echinacea purpurea* (L.) Moench and *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. **J. Food Biochem**, v. 39, n. 2015, p. 9, 2015. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jfbc.12168> >.

FARAG, M. A. et al. Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC-PDA-qTOF-MS and chemometrics. **Phytochemistry**, v. 119, p. 41-50, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26410474> >.

FDA (Food and Drug Administration). **Guidance for Industry Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations**. U.S. Department of Health and Human Services. United States: Food and Drug Administration, 2012. 79 p.

GODECKE, T. et al. Phytochemistry of cimicifugic acids and associated bases in *Cimicifuga racemosa* root extracts. **Phytochem Anal**, v. 20, n. 2, p. 120-33, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19140115> >.

GUO, Y. et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of the genus *Cimicifuga*: A review. **J Ethnopharmacol**, v. 209, p. 264-82, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28826891> >.

HAUSLER, M. et al. Determination of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids in *Cynara scolymus* L. by High Performance Liquid Chromatography. **Chromatographia**, v. 52, n. 2002, p. 5, 2002. Disponível em: < <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF02492002.pdf> >.

JABRI, M.-A. et al. HPLC/PDA/ESI-MS/MS analysis of chamomile decoction and mechanism of its protective effects on aspirin-induced small bowel injuries. **R Soc Chem**, v. 2017, n. 7, p. 9,

2017. Disponível em: <
<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2017/RA/C7RA07339A#!divAbstract>>.

Ji, S. et al. Separation and characterization of chemical constituents in *Ginkgo biloba* extract by off-line hydrophilic interaction reversed-phase two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 146, p. 68-78, 2017. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28854404>>.

JIANG, B. et al. Analysis of formononetin from black cohosh (*Actaea racemosa*). **Phytomedicine**, v. 13, n. 7, p. 477-86, 2006. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785040>>.

KRATZ, J. M. et al. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 6, p. 531-7, 2011. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21584437>>.

LI, W. et al. Identification of caffeic acid derivatives in *Actea racemosa* (*Cimicifuga racemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 17, n. 9, p. 978-82, 2003. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717772>>.

LUZ, A. B. G. et al. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **Int Immunopharmacol**, v. 36, p. 165-172, 2016. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27155392>>.

MANCEK, B.; KREFT, S. Determination of cichoric acid content in dried press juice of purple coneflower (*Echinacea purpurea*) with capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 66, n. 5, p. 1094-7, 2005. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970094>>.

MARQUES, G. S. et al. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 33, n. 1, p. 6,

2012. Disponível em: < serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/download/1773/1773 >.

MINCSOVICS, E. et al. *In-situ* clean-up and OPLC fractionation of chamomile flower extract to search active components by bioautography. **J Planar Chromat**, v. 26, n. 2013, p. 7, 2013. Disponível em: < real.mtak.hu/8116/2/Mincsovics_JPC_2013_revised_repozit.pdf >.

PATIL, A. G. et al. Validation of quinidine as a probe substrate for the *in vitro* P-gp inhibition assay in Caco-2 cell monolayer. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v. 36, n. 3, p. 115-9, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725799> >.

PETRULOVA-PORACKA, V. et al. Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: aglycones and glycosides. **Food Chem**, v. 141, n. 1, p. 54-9, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23768326> >.

PIRES, F. B. et al. Qualitative and quantitative analysis of the phenolic content of *Conarus var. angustifolius*, *Cecropia obtusa*, *Cecropia palmata* and *Mansoa alliacea* based on HPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS. **Rev Bras Farmacogn**, v. 27, n. 2017, p. 426-33, 2017. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v27n4/0102-695X-rbfar-27-04-0426.pdf> >.

RATES, S. M. K. Metilxantinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 26, 486 p.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **J Chromatogr A**, v. 1012, n. 2, p. 119-28, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14521308> >.

SCHUTZ, K. et al. Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Anal Bioanal Chem**, v. 384, n. 7-8, p.

1511-7, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16534575> >.

SINGH, O. et al. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. **Pharmacogn Rev**, v. 5, n. 9, p. 82-95, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22096322> >.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1112-6, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406391> >.

WANG, M. et al. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 3, p. 601-8, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12537429> >.

ZUANAZZI, J. Â. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 15, 486 p.

CAPÍTULO III

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ANALÍTICO POR CLUE-EM/EM & AVALIAÇÃO DAS
INTERAÇÕES ENTRE PLANTAS MEDICINAIS E FÁRMACOS
NO TRANSPORTE BIDIRECIONAL UTILIZANDO CÉLULAS
CACO-2**

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste Capítulo são apresentados os resultados do desenvolvimento e da validação de um método analítico por CLUE-EM/EM para detecção e quantificação simultânea dos fármacos marcadores utilizados nos ensaios de transporte bidirecional com células Caco-2. Posteriormente, são discutidos os efeitos *in vitro* dos extratos em estudo sobre o transporte bidirecional dos fármacos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram utilizados os extratos secos das plantas medicinais *Cynara scolymus*; *Matricaria recutita*; *Camellia sinensis*; *Cecropia glaziovii*; *Echinacea* sp.; *Cimicifuga racemosa*; *Ilex paraguariensis*; *Ginkgo biloba* e *Bauhinia forficata*. Dados específicos sobre os extratos, bem como seus fornecedores estão descritos no Capítulo II. O extrato de soja não foi testado utilizando a metodologia discutida neste Capítulo por questões de estratégia experimental e por essa ser uma planta bastante estudada, sendo dada prioridade para plantas menos exploradas e descritas na literatura (ALMEIDA et al., 2015; BOGACZ, A. et al., 2014; DO et al., 2011; VILLARROEL et al., 2011).

Os fármacos quinidina, sulfassalazina e verapamil (pureza $\geq 99\%$), o composto curcumina (pureza $\geq 80\%$) bem como os reagentes *Lucifer Yellow*, HEPES [4-(2-hidroxietil) -1-piperazinil] etanosulfonato, MES [ácido 2-(N-Morfolino) etano sulfônico], ácido fórmico, bicarbonato de sódio e o tampão HBSS (*Hank's balanced salt solution*) e tripsina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O fármaco propranolol foi obtido do INCQ (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Brasil) (pureza $\geq 99\%$). A solução de haloperidol 5mg/mL (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA) foi cedida pelo Departamento de Farmacologia (FMC, CCB, UFSC). O dimetilsulfóxido, (DMSO) e a acetonitrila grau HPLC foram adquiridos da Merck. O meio de cultura celular DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 4,5 g/L de glicose e o SFB (soro fetal bovino) foram adquiridos da Gibco. Os aminoácidos não essenciais, a L-glutamina e a solução de PS (10.000 U de penicilina G, 10.000 μ g

de estreptomicina) foram obtidos da Cultilab. Todos os reagentes usados neste estudo possuíam alto grau de pureza.

2.2 Cultura de células Caco-2

As células Caco-2, células de adenocarcinoma de cólon humano (#HTB-37), obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), foram mantidas em meio DMEM contendo alto teor de glicose (4,5 g/L), suplementado com 10% de SFB e 1% de L-glutamina e de aminoácidos não essenciais. As células foram incubadas nas condições padrão de cultivo (37°C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida) até atingirem a confluência de 80% e subcultivadas em insertos do modelo *Transwell* para os ensaios de transporte bidirecional. Durante a manutenção das células nos insertos, foi adicionado 1% de PS ao meio de cultura.

2.3 Preparação dos insertos

As células Caco-2 foram subcultivadas em insertos contendo uma membrana semipermeável de policarbonato (área de superfície 1,12 cm², tamanho dos poros 0,4 µM Transwell® Permeable Support, Corning) dispostos em placas de 12 cavidades.

Os insertos foram incubados com meio DMEM contendo 4,5 g/L de glicose sem suplementação por 30 min nas condições padrão de cultivo, anteriormente à semeadura das células. As células foram dissociadas das garrafas utilizando 1-2 mL da solução de tripsina-EDTA (0,25%), ressuspensas em DMEM contendo 4,5 g/L de glicose suplementado e semeadas na densidade de $1,87 \times 10^5$ células/inserto. As placas foram incubadas de 21 a 25 dias para a ocorrência da diferenciação e utilização nos experimentos. O meio de cultura foi substituído a cada 2-3 dias durante o período de cultivo nas garrafas e de manutenção nos insertos. Nos insertos foram aplicados 500 µL de meio suplementado no compartimento apical e 1.500 µL no compartimento basolateral para a manutenção das células.

2.4 Controle de qualidade das células Caco-2

A qualidade da monocamada das células Caco-2 foi avaliada quanto a sua integridade e diferenciação celular. A integridade foi analisada por medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) e pela permeabilidade do marcador *Lucifer Yellow*. A diferenciação celular foi avaliada por marcação dos filamentos de F-actina com o corante rodamina-faloidina e das junções oclusivas com anticorpos específicos. Essas metodologias são recomendadas e tradicionalmente utilizadas para o controle de qualidade das células Caco-2 empregadas em ensaios de transporte bidirecional (FERRUZZA et al., 2012; HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007; SRINIVASAN et al., 2015).

2.4.1 Medida da resistência elétrica transepitelial (TEER)

Todos os insertos utilizados tiveram a TEER mensurada anteriormente e posteriormente aos experimentos. Para a tomada das medidas de TEER é aplicada uma corrente alternada e verificada a resistência elétrica em ohms (Ω) gerada pela monocamada celular (SRINIVASAN et al., 2015). Anteriormente à mensuração da TEER, o meio de cultivo foi removido, os insertos lavados com HBSS pH 7,4 e a estabilização do sistema efetuada incubando os insertos por 15 min nas condições padrão de cultivo com HBSS pH 7,4. Posteriormente, o tampão foi substituído por tampão previamente aquecido (37°C) para efetuar as medidas usando o voltímetro Millicell® ERS (Millipore) seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. A TEER final foi calculada pela Equação 1. Como controle foi utilizado um inserto sem células.

Equação 1.
$$TEER = (R - R_b) \times A \quad (\Omega \text{ cm}^2)$$

R = Resistência mensurada em Ω

R_b = Resistência do branco em Ω

A = Área do filtro em cm^2

2.4.2 Permeabilidade do marcador *Lucifer Yellow*

O composto fluorescente *Lucifer Yellow*, por ter baixa permeabilidade transcelular, foi utilizado como marcador para

avaliar a integridade da monocamada celular no final dos ensaios de transporte bidirecional. O composto foi diluído em HBSS pH 7,4 na concentração de 100 µg/mL e aplicado no compartimento apical (400 µL) dos insertos, enquanto ao compartimento basolateral foi adicionado apenas HBSS pH 7,4 (1.200 µL). Os insertos foram incubados protegidos da luz a 37°C em agitador orbital a 100 rpm por 1 h. A porção do marcador que permeou a monocamada celular teve a fluorescência quantificada utilizando o espectrofotômetro SoftMax® Pro - Molecular Devices nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/530 nm (Figura III. 1). A P_{app} do *Lucifer Yellow* foi calculada utilizando a Equação 2.

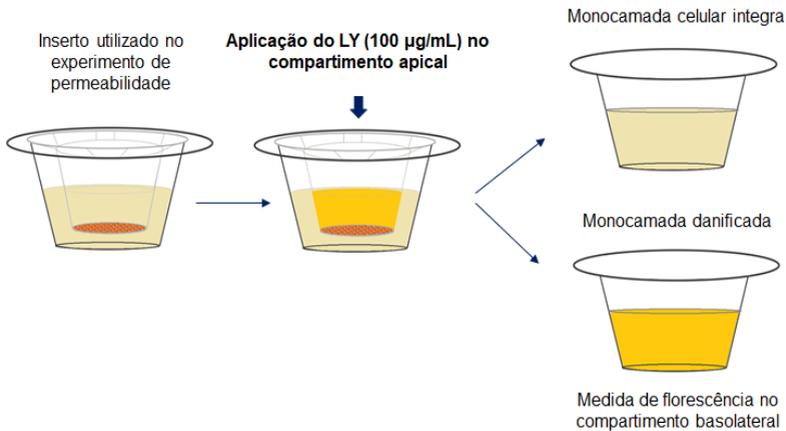
Equação 2.
$$P_{app} = \frac{(\Delta Q)}{(\Delta t)} \times \frac{1}{A \times C_o} \quad (\text{cm/s})$$

$(\Delta Q)/(\Delta t)$ = Variação da concentração inicial no tempo em mol/s

A = Área do filtro em cm²

C_o = Concentração inicial no compartimento doador em mol/mL

Figura III. 1 - Ilustração do ensaio de permeabilidade do *Lucifer yellow* (LY).



Fonte: A autora.

2.4.3 Marcação dos filamentos de F-actina com o corante rodamina-faloidina e análise da formação das junções oclusivas por imunofluorescência

As células Caco-2 foram cultivadas em insertos ou lâminas tipo *coverslip* por 21-25 dias nas condições de cultivo já descritas. As membranas semipermeáveis dos insertos contendo as células foram removidas e deixadas sobre uma lâmina de vidro até secarem. Após as células se fixarem na lâmina ou posteriormente à remoção das *coverslip* das placas de cultivo, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma) em PBS por 15 min e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% (Sigma) em PBS por 10 min sob agitação (60 rpm).

A formação da F-actina foi avaliada por marcação das células Caco-2 com o corante fluorescente rodamina-faloidina (1:200 v/v) (Invitrogen) por 30 min sob agitação (60 rpm). Finalizada a incubação, as células foram lavadas com PBS e analisadas em microscópio de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação/emissão 510-550/590 nm.

A formação das junções oclusivas foi verificada após fixação e permeabilização das células e marcação com o anticorpo Mouse anti-ZO-1 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1.000 v/v) por 30 min sob agitação a 60 rpm. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Goat anti-mouse Alexa Fluor 448 (Invitrogen) (1:1.000 v/v) por 30 min sob agitação 60 rpm. As monocamadas celulares foram analisadas em microscópio de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 460-490/520 nm.

O material nuclear foi marcado com o corante Hoechst 32258 (1 µg/mL) por 30 min, e analisado por microscopia de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação/emissão 330 - 380/440 nm.

As imagens obtidas após as marcações foram adquiridas utilizando o microscópio de fluorescência Olympus IX71 e processadas com o programa Cell^P Olympus images.

2.5 Preparação das amostras para as análises de transporte bidirecional

Os fármacos (quinidina, sulfassalazina, propranolol e verapamil) e o composto de origem natural curcumina foram

solubilizados em DMSO (100 mM) para preparação das soluções-estoque, as quais foram diluídas em tampão HBSS para aplicação nas células Caco-2. A concentração final de DMSO após diluição no tampão foi inferior a 1%. O fármaco haloperidol foi diluído diretamente em tampão, visto que foi obtido na forma de solução.

Os extratos foram solubilizados em HBSS na concentração de 1 mg/mL, sonificados e filtrados assepticamente em membrana de 0,22 µm para a obtenção das soluções-estoque. Para uso, os extratos foram diluídos em HBSS (100 µg/mL) para aplicação direta ou em combinação com os fármacos marcadores.

2.6 Ensaios de transporte bidirecional utilizando o modelo *Transwell* e células Caco-2

Células Caco-2, entre as passagens 121 e 128, foram cultivadas por 21 a 25 dias nos insertos. Após a confirmação da adequada formação da monocamada celular, foram efetuados os ensaios de transporte bidirecional utilizando o modelo *Transwell*. Como fármacos marcadores foram utilizados quinidina (100 µM, substrato da P-gp) e sulfassalazina (100 µM, substrato da BCRP); como inibidores os fármacos haloperidol e verapamil (50-100 µM, inibidores da P-gp) e o composto de origem natural curcumina (100 µM, como inibidor da BCRP). Como controle experimental foi utilizado o propranolol (25 µM).

Anteriormente a cada experimento, as células foram pré-incubadas com o tampão HBSS pH 7,4 (controle), com a solução dos extratos (100 µg/mL) ou com a solução dos inibidores, aplicados em ambos os compartimentos do sistema por 30 min.

Para a avaliação da permeabilidade, 400 µL do fármaco marcador diluído em tampão HBSS pH 6,5 foram aplicados no compartimento apical, enquanto que no compartimento basolateral foram adicionados 1.200 µL de tampão HBSS pH 7,4 para os ensaios com quinidina, e de tampão HBSS pH 6,5 para os ensaios com sulfassalazina. Para a avaliação do efluxo, 1.200 µL do fármaco marcador diluído em tampão HBSS pH 7,4 ou pH 6,5 foram aplicados no compartimento basolateral para as análises com quinidina e sulfassalazina respectivamente, enquanto que no compartimento apical foram adicionados 400 µL de tampão HBSS pH 6,5.

As placas foram incubadas em agitador orbital na temperatura de 37°C sob agitação de 150 rpm. Alíquotas de 200 µL do compartimento apical, para as análises de efluxo, e de 600 µL do compartimento basolateral, para as análises de permeabilidade, foram coletadas a cada 30 min durante 2 h. Logo após a remoção das alíquotas, o mesmo volume de amostra removido foi substituído pelo tampão HBSS pré-aquecido com pH correspondente para cada compartimento. O tempo de experimento de 2 h seguiu o recomendado na literatura e está próximo ao tempo de trânsito de substâncias no intestino delgado, que é de 3-4 horas (TOZER; ROWLAND, 2009).

As alíquotas coletadas foram secas usando o concentrador SpeedVac (Thermo) e os sedimentos armazenados a -20°C até execução dos procedimentos de extração e quantificação por CLUE-EM/EM. Os valores de P_{app} foram calculados conforme a Equação 2, previamente descrita. A relação entre permeabilidade e efluxo foi determinada conforme a Equação 3.

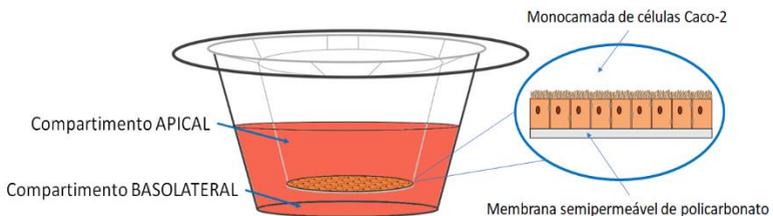
Equação 3. $Relação = \frac{P_{app} \text{ BL-AP}}{P_{app} \text{ AP-BL}}$

$P_{app} \text{ BL-AP}$ = Permeabilidade aparente no sentido BL-AP (cm/s)

$P_{app} \text{ AP-BL}$ = Permeabilidade aparente no sentido AP-BL (cm/s)

Particularidades desse ensaio podem ser visualizadas no Quadro III. 1 e na ilustração do sistema *Transwell* apresentado na Figura III. 2.

Figura III. 2 - Ilustração do sistema *Transwell* para estudo de transporte bidirecional com células Caco-2



Fonte: A autora.

Quadro III. 1 - Particularidades do ensaio de transporte bidirecional com células Caco-2.

Proteína de efluxo alvo	Substrato	pKa*	Concentração	Inibidor	pH do HBSS*** Apical	pH do HBSS Basolateral
P-gp	Quinidina	8,6	100 µM	Verapamil 100 µM ou Haloperidol 50 µM**	6,5	7,4
BCRP	Sulfassalazina	0,6	100 µM	Curcumina 100 µM	6,5	6,5

* Dados PubChem (KIM et al, 2016).

** Fármaco inibidor, mas não substrato da P-gp (IWAKI et al., 2006).

*** HBSS (CaCl₂; KCl; KH₂PO₄; MgCl₂; MgSO₄; NaCl; NaHCO₃ e Na₂HPO₄) + 10 mM HEPES ou 10 mM MES + 0,35 g NaHCO₃.

O pH influencia fortemente as características de transporte dos fármacos (NEUHOFF et al., 2003). Assim, os valores de pH do tampão HBSS utilizados (6,5 e 7,4), em cada compartimento, foram ajustados para mimetizar as condições *in vivo*, visto que o pH médio do intestino delgado proximal é de 6,6 e o pH sanguíneo é de aproximadamente 7,4 (TOZER; ROWLAND, 2009).

Devido à baixa permeabilidade da sulfassalazina, foi utilizado o pH de 6,5 em ambos os compartimentos, a fim de melhorar o transporte deste marcador neste caso específico. O uso de pH semelhante em ambos os compartimentos do sistema *Transwell* ou de variações no pH é uma estratégia utilizada *in vitro* para estudos de permeabilidade com células Caco-2 (GONÇALVES et al., 2012). Para a sulfassalazina, esse recurso foi utilizado para manter constante o grau de ionização do fármaco e evitar a influência do pH na permeabilidade, permitindo a quantificação do analito (DAHAN; AMIDON, 2009; 2010).

2.7 Desenvolvimento e validação de método por CLUE-EM/EM

O desenvolvimento e a validação do método analítico e a quantificação das amostras resultantes dos experimentos de transporte bidirecional foram efetuados na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob supervisão do Prof. Dr. Fernão Castro Braga. Essa etapa do trabalho foi desenvolvida durante o estágio de quatro meses da autora desta Tese no Laboratório de Fitoquímica, do Departamento de Produtos Farmacêuticos, da Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG.

2.7.1 Preparação das amostras

Os sedimentos das amostras foram reconstituídos em água Milli-Q pH 6,5 e sonicados por 30 min. Após, foi efetuada a precipitação das proteínas e do excesso de sal com acetonitrila (1:1 v/v). As amostras foram agitadas em equipamento tipo Vortex e incubadas por 10 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 5 min a 9.000 x g e filtradas em membrana de 0,22 µm (FilterPro 13 mm PTFE - Saint Vallen & Aprolab) para injeção no equipamento de CLUE.

Para a validação do método, os fármacos marcadores foram solubilizados em HBSS pH 6,5, isoladamente ou em combinação, e submetidos ao procedimento descrito acima. Controles foram analisados após a solubilização direta dos fármacos em metanol. As amostras em metanol foram utilizadas durante o desenvolvimento do método por CLUE EM/EM.

2.7.2 Equipamentos

Para as análises foi utilizado o sistema cromatográfico de ultra eficiência Acquity Ultra Performace LCTM system (Waters), equipado com detector de arranjos fotodiodos 2996 (PDA) e amostrador automático. Para a separação foi utilizada a coluna BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) Acquity UPLC® (Waters) acoplada a uma pré-coluna BEH C18 SB (2,1 x 5 mm, 1,7 µm) Acquity UPLC® (Waters). A detecção foi efetuada com o detector de espectrometria de massas Acquity TQ equipado com fonte de ionização de elétrons Z-spray (ESI) (Waters). Os dados foram

adquiridos e processados com o programa MassLynx, Versão 4.1 (Waters).

2.7.3 Condições cromatográficas

A fase móvel utilizada para a cromatografia foi 0,2% de ácido fórmico (A) e acetonitrila acidificada com 0,2 % de ácido fórmico (B). Para a separação foi aplicado o seguinte gradiente: 30 s a 10% de B; gradiente linear de 10-95% de B por 2 min seguido de manutenção a 95% de B por 1 min. Posteriormente, a coluna foi reequilibrada nas condições iniciais por 1,5 min. O tempo total de corrida foi de 5 min, incluindo o tempo de reequilíbrio da coluna. O fluxo foi otimizado para 0,5 mL/min, as amostras conservadas na temperatura de 15°C e a coluna mantida a 40°C.

2.7.4 Condições espectrométricas (EM/EM)

Para a detecção e quantificação dos fármacos foi utilizada a dissociação induzida por colisão, o modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) em duas transições (quantificação e confirmatória) para cada analito, para maximizar a sensibilidade e especificidade do método. Foram testados os modos de ionização positivo e negativo (ESI + e ESI -), tendo sido selecionado o modo de ionização positivo (ESI +) para todos os fármacos (quinidina, sulfassalazina e propranolol) por este apresentar os melhores resultados para a detecção. As condições espectrométricas foram estabelecidas após infusão direta dos fármacos dissolvidos em metanol (soluções à 1 µg/mL e 0,5 mg/mL). As condições adotadas após a otimização do método estão descritas no Quadro III. 2. O desenvolvimento do método analítico foi efetuado com o auxílio da especialista na área a Bióloga Daniele Hamamoto.

Quadro III. 2 - Parâmetros espectrométricos utilizados para detecção e quantificação dos fármacos marcadores (ESI +).

Fármacos marcadores	Massa (g/mol) *	Íon Precursor (m/z)	TR (min)	Cone (V)	Transição para quantificação		Transição confirmatória	
					(m/z)	EC (eV)	(m/z)	EC (eV)
Quinidina	324,424	325,20	1,08	35,0	81,0	32,0	160,0	28,0
Sulfassalazina	398,393	399,10	1,72	40,0	223,1	30,0	119,0	45,0
Propranolol	259,349	260,20	1,56	30,0	98,0	20,0	116,0	20,0

* Massas teóricas obtidas no banco de dados PubChem (KIM et al, 2016); TR - Tempo de retenção; EC – Energia de colisão.

2.7.5 Validação do método analítico

O método analítico desenvolvido por CLUE-EM/EM foi validado seguindo as recomendações da RDC 166 de 24 de julho de 2017, a qual estabelece critérios para a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017). Foram determinados os parâmetros de linearidade, faixa linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), especificidade, precisão (intra e interdia), exatidão, efeito matriz e robustez do método.

A faixa dinâmica, a **faixa linear** e a **linearidade** foram determinadas pela construção de curvas de concentração nominal (μM) versus área absoluta dos picos (%) com concentrações dos fármacos variando entre 0,625 a 80 μM para a faixa dinâmica, e de 0,625 a 40 μM para a faixa de linearidade. Foram utilizados sete pontos para cada curva para a determinação da linearidade, efetuadas três determinações por ponto e duas análises independentes. As curvas foram avaliadas por regressão linear e o **LD** e o **LQ** foram estipulados seguindo as equações 4 e 5, respectivamente.

Equação 4. $LD = \frac{3.3 \sigma}{IC}$

Equação 5. $LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$

σ = Desvio padrão residual da linha de regressão

IC = Inclinação da curva de calibração

A **especificidade** foi verificada por injeção do tampão HBSS no equipamento de CLUE-EM/EM e de cada um dos extratos em estudo após a precipitação com acetonitrila. Misturas dos fármacos também foram injetadas para a detecção de *cross-talk* durante a detecção e quantificação.

A **precisão** foi avaliada utilizando seis determinações a 40 µM (100%) com três repetições para cada nível. A repetibilidade foi analisada no mesmo dia (n = 18) e em dias diferentes (n = 36). A partir dos dados obtidos foi calculado o desvio padrão relativo (DPR %).

A **exatidão** foi verificada usando três concentrações, contemplando o intervalo linear (0,625; 20; 40 µM), com três réplicas em cada nível e três análises independentes (n = 27). As concentrações foram determinadas com base na curva de calibração e comparadas com o valor teórico. A partir dos dados obtidos foi calculado o desvio padrão relativo (DPR %).

O **efeito matriz** foi analisado por fortificação do tampão HBSS ou das soluções de extratos com os fármacos e posterior precipitação com acetonitrila. As concentrações e os pontos adotado para a análise seguiram o mesmo procedimento de determinação da curva de linearidade, com três repetições para cada nível. A área absoluta obtida para cada fármaco quantificado na solução de cada extrato foi comparada com as áreas obtidas para os fármacos em HBSS (100%). Os dados foram avaliados por regressão linear e os coeficientes angulares das retas comparados estatisticamente.

A **robustez** foi determinada por método univariado, com variações deliberadas dos parâmetros. Foi avaliada a influência do material da membrana dos filtros utilizados para preparação das amostras, sendo testado o modelo em PVDF (Millex-GV 13mm - Millipore) em comparação com o filtro PTFE (FilterPro 13 mm - Saint Vallen & Aprolab) utilizado; alteração no fluxo dos eluentes

em $\pm 10\%$; variações na concentração de ácido fórmico na fase móvel (0,15%); troca da coluna cromatográfica pelo modelo Acquity UPLC® HSS C18 SB (2,1 x 50 mm, 1,8 μm) e alteração na temperatura de dessolvatação em $\pm 10\%$. Cada parâmetro foi analisado em três concentrações diferentes dos fármacos (0,625; 20 e 40 μM) com três repetições para cada nível.

A **estabilidade** analítica das soluções foi constatada por injeções repetidas das mesmas soluções, armazenadas a 4°C, em dias diferentes. O tempo de extração não foi avaliado, pois o método empregado no preparo da amostra baseia-se na solubilidade dos interferentes. Modificações na fase móvel [alterações por metanol, acetato de amônio (10 mM), ácido fórmico 0,2% e acetonitrila em diferentes combinações e proporções (v/v)] foram testadas, porém, devido a obtenção de picos cromatográficos assimétricos ou com sinal comprometido, as amostras não foram quantificadas.

2.8 Análise estatística

Os dados foram analisados com os programas Microsoft Excel® 2016 e GraphPad Prism V.5. utilizando regressão linear, teste *t* de Student, ANOVA uma via seguida de pós-teste de Dunnett ou ANOVA duas vias com pós-teste de Sidak com intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Controle de qualidade das células Caco-2

3.1.1 Medidas da TEER

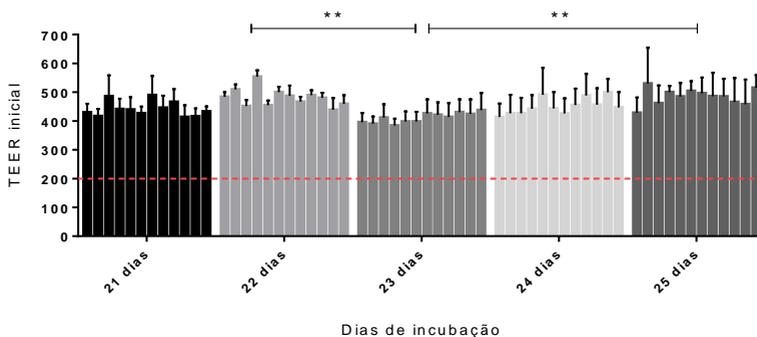
A medida da resistência elétrica transepitelial é uma técnica quantitativa que fornece resultados que refletem a integridade das junções oclusivas em células epiteliais e endoteliais formadas durante o processo de diferenciação das células Caco-2 (SRINIVASAN et al., 2015).

Durante o processo de implementação da técnica utilizando células Caco-2 foi avaliada a variação na TEER dos insertos incubados entre 21 e 25 dias. Como pode ser observado na Figura III. 3 as medidas de TEER permaneceram estáveis e acima de 200

$\Omega \text{ cm}^2$, no período de pré-incubação avaliado. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores da TEER das monocamadas celulares dos insertos dispostos nas diferentes posições da placa de cultivo de 12 cavidades. Diferença significativa ($p < 0,01$) entre os dias de incubação foram detectadas, contudo, a TEER permaneceu acima do limite mínimo estabelecido de $200 \Omega \text{ cm}^2$. Esses dados garantem a homogeneidade da formação da monocamada celular nos insertos, independentemente da localização na placa, a adequada densidade celular utilizada e a estabilidade da TEER para a realização dos ensaios subsequentes entre o 21^o e 25^o dia de pré-incubação.

Todos os demais insertos preparados foram avaliados e apenas os com valores de TEER inicial e final superiores a $200 \Omega \text{ cm}^2$ foram utilizados nos ensaios de transporte bidirecional e considerados para os cálculos da P_{app} (SRINIVASAN et al., 2015).

Figura III. 3 - Valores da TEER mensurados em insertos contendo células Caco-2, pré-incubadas por 21 a 25 dias nas condições padrão de cultivo.



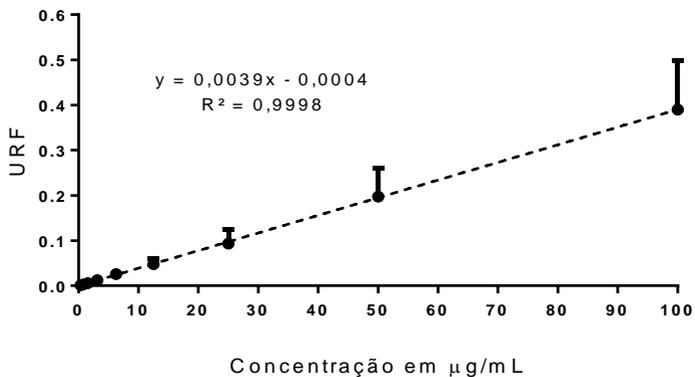
Os dados correspondem a três experimentos independentes e foram analisados por ANOVA duas vias com intervalo de confiança de 95%. Não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) na TEER inicial entre os insertos dispostos nas variadas posições nas placas de 12 cavidades. Foram detectadas diferenças significativas ** ($p < 0,01$) na TEER entre os dias de incubação (22 *versus* 23 e 23 *versus* 25). A linha pontilhada indica o limite mínimo ($200 \Omega \text{ cm}^2$) desejável para a TEER.

3.1.2 Permeabilidade do *Lucifer Yellow*

Todos os insertos utilizados nos experimentos de transporte bidirecional foram testados quanto à permeabilidade do *Lucifer Yellow*. Os dados de fluorescência obtidos foram utilizados para o cálculo da concentração do composto acumulado no compartimento basolateral. As concentrações foram determinadas com base na equação da curva de calibração ($y = 0,0039x - 0,0004$) obtida por diluição seriada da solução do marcador, relacionando a concentração nominal com a fluorescência obtida (Figura III. 4). Os dados resultantes foram empregados no cálculo da P_{app} .

Os insertos validados apresentaram $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/s, o que garante a integridade da monocamada celular (CYPROTEX, 2018).

Figura III. 4 - Curva de calibração do *Lucifer Yellow*.



Os dados estão apresentados como concentração do marcador em µg/mL *versus* a fluorescência em URF (Unidades Relativas de Fluorescência). A equação da reta ($y = 0,0039x - 0,0004$) e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9998$) foram obtidos por regressão linear.

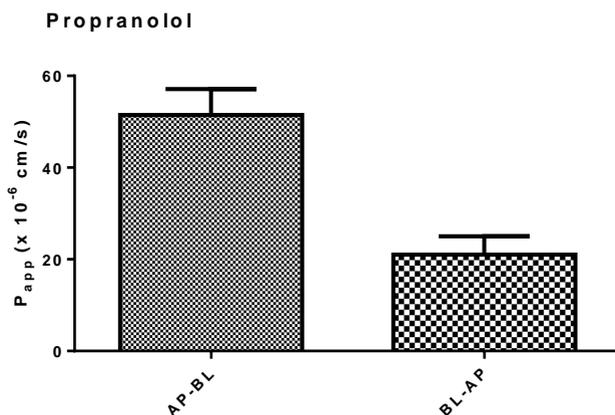
3.1.3 Permeabilidade do propranolol

Como controle experimental foi utilizado o marcador de alta permeabilidade transcelular propranolol. A média de P_{app} do propranolol no sentido AP-BL foi de $51,47 \times 10^{-6}$ cm/s, no sentido

BL-AP de $21,05 \times 10^{-6}$ cm/s e a relação P_{app} BL-AP/AP-BL de 0,41 (Figura III. 5). A P_{app} do propranolol no sentido AP-BL descrita na literatura é bastante variável (LEE et al., 2017), contudo dados semelhantes aos aqui obtidos foram descritos (TAKENAKA et al., 2016; YAMAURA et al., 2016), bem como para o sentido BL-AP (KRATZ, 2011) e para a relação de P_{app} obtida (BOCK; FLOTOTTO; HALTNER, 2004).

Por ser um fármaco de alta permeabilidade, espera-se P_{app} AP-BL maior que 5×10^{-6} cm/s para esse fármaco (BOCK et al., 2004). Sendo assim, os dados confirmam a adequada permeação do marcador propranolol na monocamada de células Caco-2.

Figura III. 5 - Valores de P_{app} do marcador de alta permeabilidade propranolol.



Dados obtidos para o propranolol (25 μ M) no sentido Apical-Basolateral (AL-BL) e no sentido Basolateral-Apical (BL-AP) versus P_{app} em cm/s.

3.1.4 Diferenciação das células Caco-2

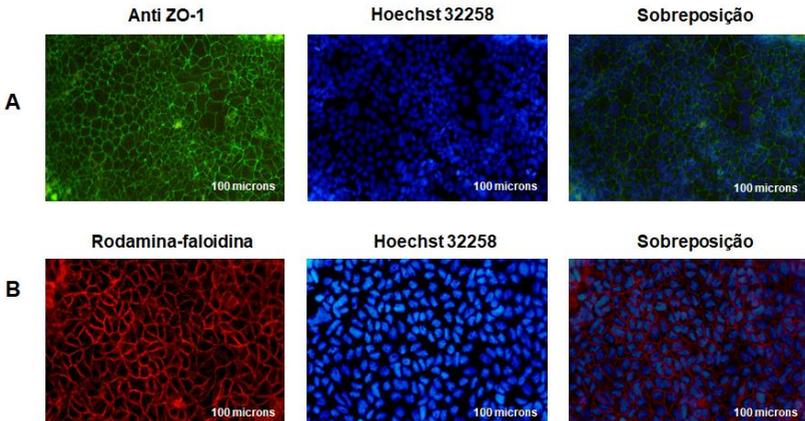
A marcação das junções oclusivas celulares por anticorpos específicos e a análise por microscopia de fluorescência é uma forma qualitativa para confirmar a diferenciação da monocamada de células Caco-2. As junções oclusivas são junções intercelulares que regulam o fluxo de solutos paracelularmente e sua formação é fundamental para a adequada avaliação do transporte de

fármacos pela via transcelular (HUBATSCH et al., 2007; TURNER et al., 2014). A verificação da formação das junções oclusivas foi efetuada por marcação das proteínas ZO-1 (Zonula occludens-1) com anticorpos específicos, que são proteínas citoplasmáticas de suporte, que conectam proteínas transmembranárias das junções oclusivas à F-actina (VAN SPAENDONK et al., 2017) e, assim, sua marcação confirma a formação das junções oclusivas.

Outra forma de analisar qualitativamente a diferenciação das células Caco-2 é a visualização da formação da F-actina por coloração com rodamina-faloidina (FERRUZZA et al., 2012). A F-actina atua conjuntamente com as junções oclusivas, regulando a passagem de solutos pela via paracelular (YUAN; RIGOR, 2010).

Como pode ser observado na Figura III. 6 as células Caco-2 utilizadas neste estudo se diferenciaram adequadamente, com a formação de junções oclusivas e adequada distribuição da F-actina nas condições de cultivo aplicadas.

Figura III. 6 - Microscopia de fluorescência de monocamadas de células Caco-2 marcadas com anticorpos Anti-ZO-1 e coradas com rodamina-faloidina indicando a diferenciação celular.



(A) As junções oclusivas marcadas com o anticorpo Anti-ZO-1 são visualizadas em verde. (B) A F-actina corada com rodamina-faloidina são visualizadas em vermelho. Em azul são visualizados os núcleos celulares corados com o corante Hoechst 32258.

3.2 Escolha dos fármacos marcadores e desenvolvimento do método de preparação das amostras

Os fármacos digoxina, sulfassalazina e quinidina foram selecionados para os testes preliminares de transporte bidirecional por serem substratos recomendados pelo FDA para estudos *in vitro* de interações medicamentosas envolvendo os transportadores P-gp e BCRP (FDA, 2016). O topotecano também foi testado, por sua vez, por ser um fármaco descrito na literatura como substrato da BCRP em estudos de transporte (BANSAL et al., 2007; MATSSON et al., 2007; REYNER et al., 2013).

Para os fármacos digoxina e topotecano não foi possível detectar o transporte no sentido AP-BL e, conseqüentemente, quantificá-los, o que inviabilizaria as análises de interações com os extratos das plantas medicinais, conforme proposto neste estudo (dados não mostrados). No intuito de favorecer a permeabilidade da digoxina, foram efetuadas análises com maior tempo de incubação (240 min) e com adição de BSA (*Bovine Serum Albumin*) 4% no compartimento basolateral (HUBATSCH et al., 2007); entretanto, não ocorreu permeação da digoxina em nenhuma das condições testadas. Sendo assim, o uso da digoxina e do topotecano para as análises seguintes foi descontinuado.

Para verificar possíveis problemas nas membranas dos insertos do sistema *Transwell* ou na monocamada celular, que pudessem estar interferindo na permeabilidade dos fármacos, foi avaliada a permeabilidade do midazolam (Nortec Química), visto que o propranolol ainda não havia sido testado. O midazolam é um fármaco de alta permeabilidade, que caracteristicamente ultrapassa a barreira célula-membrana (TOLLE-SANDER et al., 2003). Nas análises executadas, o midazolam permeou a monocamada celular e pode ser detectado, descartando problemas com o sistema *Transwell* (dados não mostrados).

De tal modo, se supôs que a não detecção dos fármacos provavelmente estava associada a baixa sensibilidade do método analítico desenvolvido para a quantificação dos fármacos em estudo. Essas análises preliminares foram efetuadas utilizando CLUE-EM em um espectrômetro de massas do tipo QToF (*Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry*). Esses equipamentos são indicados para estudos qualitativos, porém para avaliações quantitativas os espectrômetros de massas mais

recomendados são os do tipo TQ (*Triple Quadrupole Mass Spectrometry*) (LANÇAS, 2009a). Assim, as análises seguintes foram executadas utilizando um espectrômetro de massas do tipo TQ e um novo método analítico foi desenvolvido.

Apesar da digoxina ser altamente efluxada pela P-gp, o que seria interessante para os estudos de interação, esse fármaco apresenta caracteristicamente baixa permeabilidade *in vitro* em células Caco-2 (ELSBY et al., 2008). Por esse motivo, a digoxina foi substituída pelo fármaco quinidina, também substrato da P-gp, porém de alta permeabilidade (NEUHOFF et al., 2003).

O fármaco topotecano foi substituído pela sulfassalazina, também substrato da BCRP. A substituição foi considerada por a sulfassalazina ser um fármaco recomendado pelo FDA para análises *in vitro*, ser descrito em diferentes trabalhos como substrato da BCRP e por ser menos tóxico para a manipulação (FDA, 2012; FDA, 2016; LI et al., 2008; TOMARU et al., 2013).

Como inibidores foram utilizados os inibidores clássicos de P-gp, verapamil e haloperidol, e de BCRP, o composto curcumina (FDA, 2016; KARIBE et al., 2018; KRATZ, 2011; KUSUHARA et al., 2012).

Após a escolha dos fármacos marcadores, foi necessário desenvolver um método para a preparação das amostras anteriormente à injeção no equipamento de CLUE-EM/EM. A preparação da amostra é a etapa inicial da fase analítica cromatográfica e é determinante para se obter bons resultados e para o delineamento objetivo do método cromatográfico (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). A presença de sais no tampão HBSS, que compõe as alíquotas coletadas nos ensaios de permeabilidade bidirecional, prejudica a ionização dos fármacos, que é um processo fundamental para a adequada detecção e quantificação dos analitos por espectrometria de massas (LANÇAS, 2009a).

Como pode ser visto na Figura III. 7, a injeção direta da amostra em HBSS fortificada com o fármaco em análise reduziu a área dos picos em aproximadamente 96%, quando em comparação ao fármaco solubilizado diretamente em metanol (controle). Assim, para remover o excesso de sal, efetuar a precipitação proteica e gerar alíquotas mais puras para a injeção, foram testados diferentes solventes para extração/purificação dos

fármacos de interesse. O Quadro III. 3 sumariza parte das diferentes tentativas realizadas com relação ao fármaco quinidina.

Quadro III. 3 - Solventes e combinações de solventes testados para a extração/purificação das amostras de quinidina em tampão HBSS.

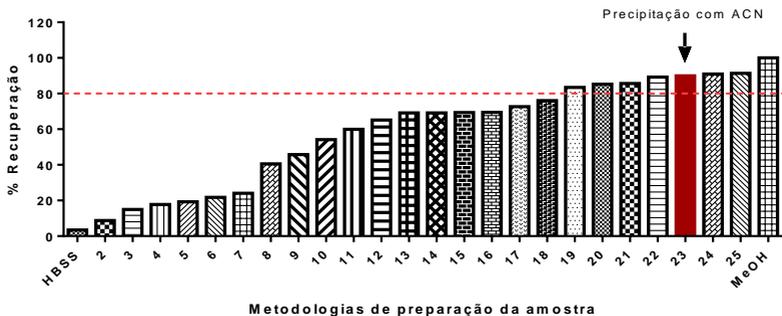
Controles	Precipitação (1:1 v/v) Fármaco solubilizado em HBSS pH 6,5
HBSS - Amostra em HBSS pH 6,5 MeOH – Amostra em metanol	12 - Metanol
	15 - Acetonitrila acidificada (20:1 v/v) *
	17 - Acetonitrila baseificada (50:1 v/v) **
	18 - Acetonitrila baseificada (200:1 v/v) **
	19 - Acetonitrila acidificada (50:1 v/v) *
	20 - Acetonitrila baseificada (20:1 v/v) **
	21 - Acetonitrila acidificada (200:1 v/v) *
	22 - Propanol
	23 - Acetonitrila
	24 - Isopropanol
25 - Etanol	
Solubilização do sedimento #	Extração líquido-líquido # (1:1 v/v) Fármaco solubilizado em HBSS pH 6,5
2 - Tetrahydrofurano	11 - Diclorometano
3 - Clorofórmio: dietilamina (4:1 v/v)	13 - Butanol
4 - Dietilamina	14 - Butanol acidificado (166:1 v/v) *
5 - Água: acetonitrila (1:1 v/v)	16 - Butanol baseificado (250:1 v/v) **
6 - Acetato de etila	
7 - Acetona: acetato de etila (1:1 v/v)	
8 - Acetona	
9 - Piridina	
10 - Butanol	

Todos os reagentes utilizados possuíam alto grau de pureza. # Amostras secas no concentrador SpeedVac e ressuspensas em metanol para a injeção. * Adição de ácido acético glacial. ** Adição de hidróxido de sódio 0,8 mM.

Como pode ser visualizado na Figura III. 7, as melhores recuperações (> 80%) foram obtidas por precipitação dos interferentes com acetonitrila (19, 20, 21 e 23), propanol (22), isopropanol (24) e etanol (25). Considerando que quanto mais próxima a composição da amostra à composição da fase móvel, menor será o ruído cromatográfico na linha de base (variações randômicas de sinal) e melhores serão os resultados, a solubilização ou dissolução das amostras na própria fase móvel é

desejada (SNYDER et al., 1997). Assim, foi selecionado o solvente acetonitrila para a precipitação dos interferentes e purificação da amostra para injeção no cromatógrafo, visto que a fase móvel era composta por esse solvente.

Figura III. 7 - Solventes testados para a preparação das amostras anteriormente à injeção no equipamento de CLUE-EM/EM



Os dados correspondem a uma triagem com o fármaco quinidina em única preparação (6,25 μM). Os dados foram utilizados apenas para obtenção de um panorama inicial para testes mais específicos com o solvente selecionado e desenvolvimento do método de preparo da amostra. HBSS - amostra em HBSS pH 6,5; 2 - tetrahydrofurano; 3 - clorofórmio; dietilamina (4:1 v/v); 4 - dietilamina; 5 - água; acetonitrila (1:1 v/v); 6 - acetato de etila; 7 - acetona: acetato de etila (1:1 v/v); 8 - acetona; 9 - piridina; 10 - butanol; 11 - diclorometano; 12 - metanol; 13 - butanol; 14 - butanol acidificado (166:1 v/v); 15 - acetonitrila acidificada (20:1 v/v); 16 - butanol baseificado (250:1 v/v); 17 - acetonitrila baseificada (50:1 v/v); 18 - acetonitrila baseificada (200:1 v/v); 19 - acetonitrila acidificada (50:1 v/v); 20 - acetonitrila baseificada (20:1 v/v); 21 - acetonitrila acidificada (200:1 v/v); 22 - propanol; 23 - acetonitrila; 24 - isopropanol; 25 - etanol; MeOH - amostra solubilizada em metanol grau HPLC.

O método analítico por CLUE-EM/EM utilizado para os testes de extração/purificação da quinidina foi desenvolvido especificamente para a quinidina e foi efetuada a validação da maioria dos parâmetros deste método. Os parâmetros avaliados foram linearidade, precisão intradia e interdia, exatidão e especificidade, os quais estavam de acordo com o esperado para um adequado método analítico. Todos os parâmetros que devem

ser avaliados para a validação parcial de um método analítico segundo a RDC N° 166 de 24 de julho de 2017 foram contemplados. Os dados obtidos podem ser verificados na Tabela III.1. Esse método foi desenvolvido e validado com o auxílio do doutorando José Hugo Gomes.

Tabela III. 1 - Dados da validação parcial do método analítico por CLUE-EM/EM utilizado para as análises de extração/purificação das amostras de quinidina.

Quinidina: Transição de quantificação 325,4 > 81,2 e de confirmação 325,4 > 160,6.			
Linearidade (R²) (0,24 – 62,5 µM)	Precisão intradia (DPR%)	Precisão interdia (DPR%)	Exatidão (DPR%)
0,999	1,499	2,589	0,24 µM – 8,643 31,25 µM – 1,494 62,50 µM – 2,514

A especificidade do método foi verificada por ausência de pico cromatográfico no tempo de retenção correspondente ao da quinidina (0,8 min), após injeção tanto do tampão HBSS como do solvente metanol (dados não mostrados).

Definido o método de preparação da amostra para a quinidina, o mesmo foi testado para os fármacos sulfassalazina e propranolol, gerando resultados satisfatórios. Por esse motivo não foi necessário efetuar a triagem com outros solventes para estabelecer métodos diferenciados de preparação das amostras para os fármacos sulfassalazina e propranolol.

3.3 Estabelecimento do método analítico por CLUE-EM/EM para detecção e quantificação simultânea dos fármacos quinidina, sulfassalazina e propranolol

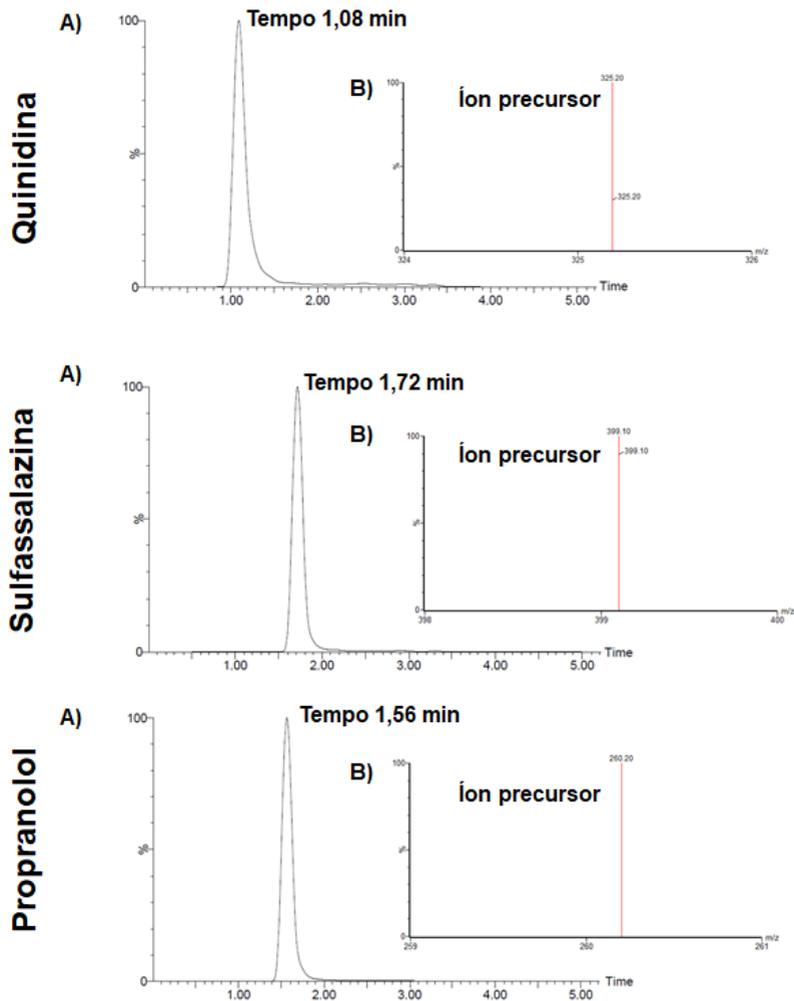
As condições cromatográficas para as análises dos fármacos quinidina, sulfassalazina e propranolol utilizando CLUE-EM/EM foram estabelecidas por injeções seguidas dos fármacos solubilizados em metanol em diferentes condições até a otimização do método. As condições espectrométricas foram determinadas após infusão direta dos fármacos solubilizados em

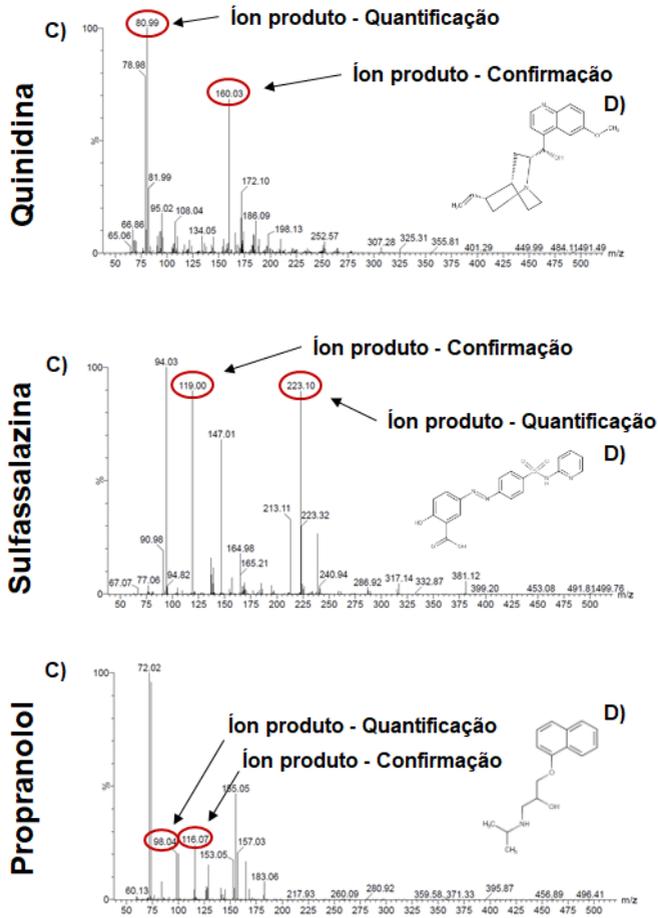
metanol no espectrômetro de massas. Os cromatogramas e espectros obtidos com o método desenvolvido podem ser visualizados na Figura III. 8. A escolha das transições para quantificação e confirmação se basearam em dados da literatura e na intensidade e estabilidade dos íons produto obtidos (HEATON et al., 2011; UMEZAWA et al., 2008; YAMAURA et al., 2016).

Todos os analitos eluíram entre os tempos de 1,08 a 1,72 min, como observado nos cromatogramas da Figura III. 8A. Nos espectros de fragmentação do íon precursor podem ser visualizados os íons produtos utilizados para a quantificação e confirmação de cada fármaco (Figura III. 8B).

Durante o desenvolvimento do método, foi testada a adição de um padrão interno (PI) para a correção das pequenas variações na injeção, que foi o fármaco metoprolol (padrão de referência *United States Pharmacopeia*) (transição de quantificação 268,1 > 116,5 e transição de confirmação 268,1 > 191,5). Entretanto, devido ao PI não favorecer a correção da área dos picos, a quantificação relativa foi desconsiderada e todos os cálculos de concentração foram efetuados com base na área absoluta dos picos para cada analito utilizando a equação da reta das curvas de linearidade.

Figura III. 8 - Cromatogramas e espectros dos fármacos marcadores obtidos utilizando o método de CLUE-EM/EM desenvolvido.





(A) Cromatogramas dos íons selecionados para cada fármaco marcador apresentados em tempo de análise *versus* abundância relativa (quinidina 81,0 m/z ; sulfassalazina 223,1 m/z ; propranolol 98,0 m/z). Dados obtidos por injeção de 40 μ M no CLUE-EM/EM (B) Espectros de massas (ESI +) mostrando os íons precursores apresentados em m/z *versus* abundância relativa (quinidina 325,20 m/z ; sulfassalazina 399,10 m/z ; propranolol 260,20 m/z). Dados obtidos por injeção de 40 μ M no CLUE-EM/EM. (C) Espectros mostrando o perfil de fragmentação do íon precursor e os íons produto utilizados para as transições de quantificação e confirmação em m/z *versus* abundância relativa. Dados obtidos por infusão direta de 1 μ g de cada fármaco (D) Representação da estrutura química dos fármacos marcadores.

3.4 Validação do método analítico por CLUE-EM/EM para detecção e quantificação simultânea dos fármacos quinidina, sulfassalazina e propranolol

A validação de um método analítico tem como propósito controlar fatores que podem gerar imprecisão ou inexatidão nos dados gerados (LANÇAS, 2009b). Devido à sensibilidade e precisão necessárias para a quantificação das amostras adquiridas nos ensaios de transporte bidirecional com células Caco-2, optou-se por efetuar a validação do método analítico seguindo as publicações mais atualizadas sobre o assunto. Como base para a validação foi utilizada a RDC 166 de 24 de julho de 2017, adotando os critérios nela estabelecidos (BRASIL, 2017). Os dados de validação obtidos podem ser visualizados na Tabela III.2.

A faixa linear estabelecida (0,625 – 40 μM) foi suficiente para a quantificação dos fármacos em estudo. A concentração máxima dos fármacos aplicada nos ensaios de transporte bidirecional foi de 100 μM , concentração diluída após a preparação da amostra de forma a se ajustar à faixa linear. A curva de linearidade apresentou R^2 maior que 0,99, demonstrando adequada linearidade do método.

A partir dos coeficientes angulares das retas, pode-se verificar comparativamente que a sensibilidade do método para cada analito se encontra nesta ordem: propranolol > quinidina > sulfassalazina. Os limites de detecção e quantificação foram muito inferiores às concentrações mais baixas mensuradas e quantificadas nas amostras em análise (centenas de nM), assegurando a confiabilidade da quantificação dos analitos.

A precisão intradia e interdia apresentou DPR menor que 5%, o que indica precisão adequada de análise para todos os fármacos. A exatidão, determinada em três níveis da faixa linear (concentrações alta, média e baixa), apresentou um DPR menor que 10%, também indicando exatidão adequada do método para todos os fármacos (Tabela III. 2).

Tabela III. 2 - Dados de validação do método de detecção e quantificação por CLUE-EM/EM dos fármacos marcadores quinidina, sulfassalazina e propranolol.

Fármaco	Equação ($y = ax + b$)	(R²) ($> 0,99$)	Faixa linear (μM)	LD (nM)	LQ (nM)
Quinidina	Y = 1917,8 x	0,994	0,625 – 40,0	3,48	10,55
Sulfassalazina	Y = 716,19 x	0,999	0,625 – 40,0	6,05	18,34
Propranolol	Y = 4558,7 x	0,994	0,625 – 40,0	2,73	8,28

Fármaco	Precisão (%)		Concentração nominal (μM)	Exatidão (%)	
	Intradia (DPR%)	Interdia (DPR%)		Intradia (DPR%)	Interdia (DPR%)
Quinidina	1,996	3,587	0,625	7,96	9,13
			20,0	4,77	6,13
			40,0	2,80	4,42
Sulfassalazina	3,202	3,231	0,625	4,57	7,15
			20,0	3,85	6,25
			40,0	2,25	6,68
Propranolol	2,119	4,843	0,625	5,03	6,42
			20,0	2,18	4,11
			40,0	1,49	3,72

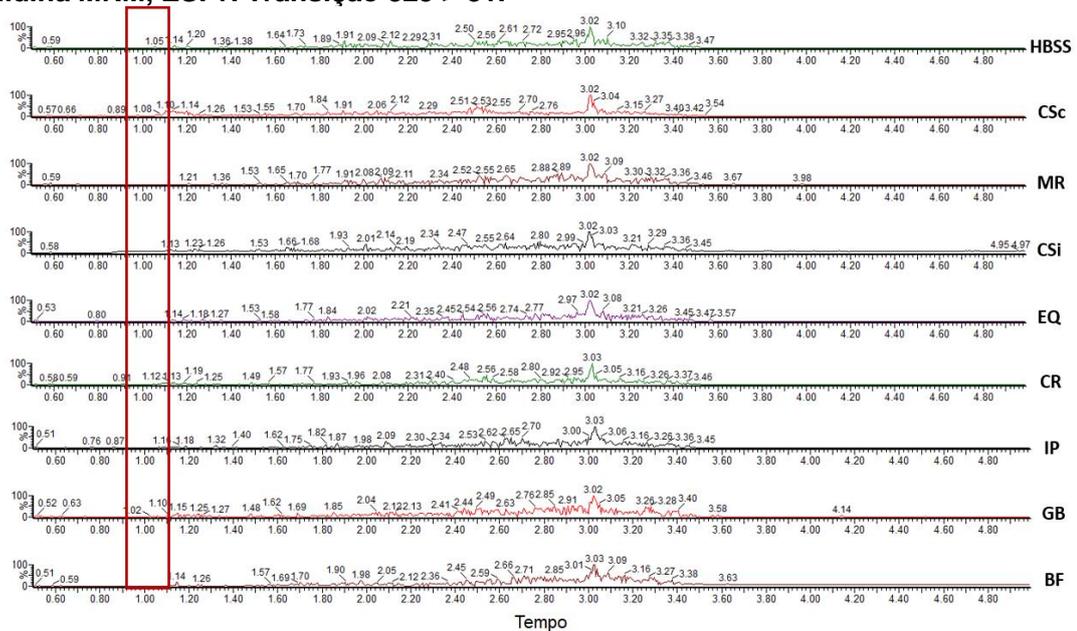
Como as amostras utilizadas neste trabalho são constituídas por extratos, que são misturas complexas de diferentes compostos químicos, a avaliação da especificidade do método se torna fundamental. Como pode ser observado na Figura III. 9, nenhum sinal foi detectado nos tempos de retenção dos fármacos marcadores após injeção da solução dos extratos em HBSS previamente processadas. Apenas picos indicativos de ruído foram detectados. Assim, o método se mostrou específico para os analitos em estudo.

Considerando que os analitos que necessitam ser quantificados estão solubilizados no tampão HBSS ou nas soluções dos extratos das plantas medicinais nesse tampão, qualquer interferência da matriz poderia prejudicar a reprodutibilidade dos resultados. Como pode ser observado na Figura III. 10, foram estabelecidas curvas de concentração *versus* área dos picos, semelhantemente ao efetuado nas análises de linearidade para os analitos solubilizados nas diferentes matrizes.

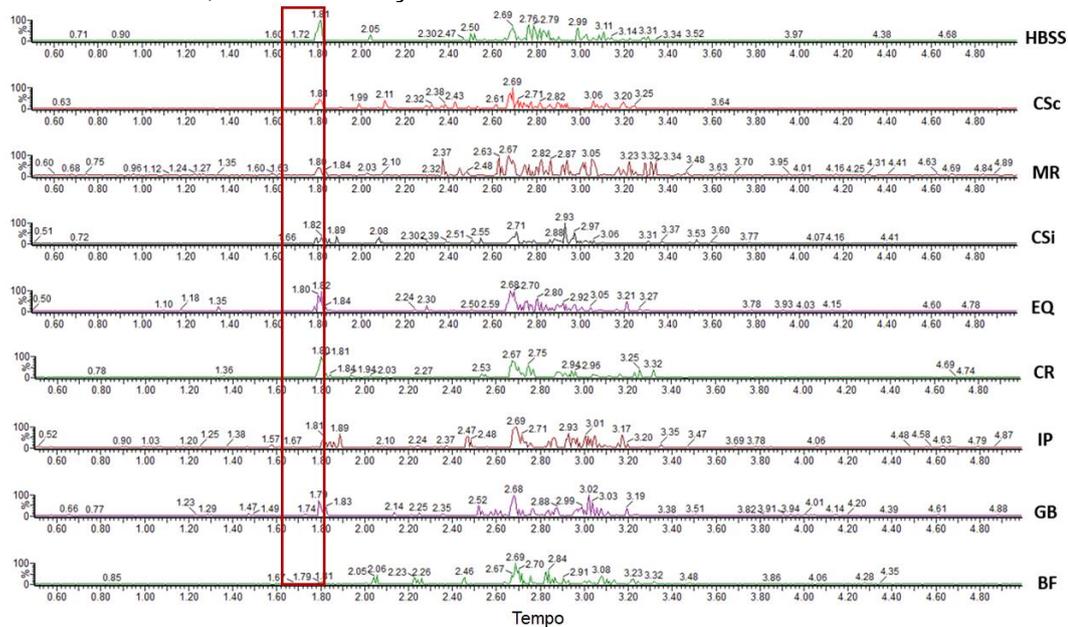
Por regressão linear e comparação dos coeficientes angulares das curvas obtidas no tampão HBSS e nos diferentes extratos, foi verificado que os coeficientes angulares não diferem significativamente, indicando que os extratos não interferem na quantificação dos analitos em estudo após o preparo da amostra

Figura III. 9 - Cromatogramas do tampão HBSS e das soluções dos extratos analisados pelo método de CLUE-EM/EM desenvolvido.

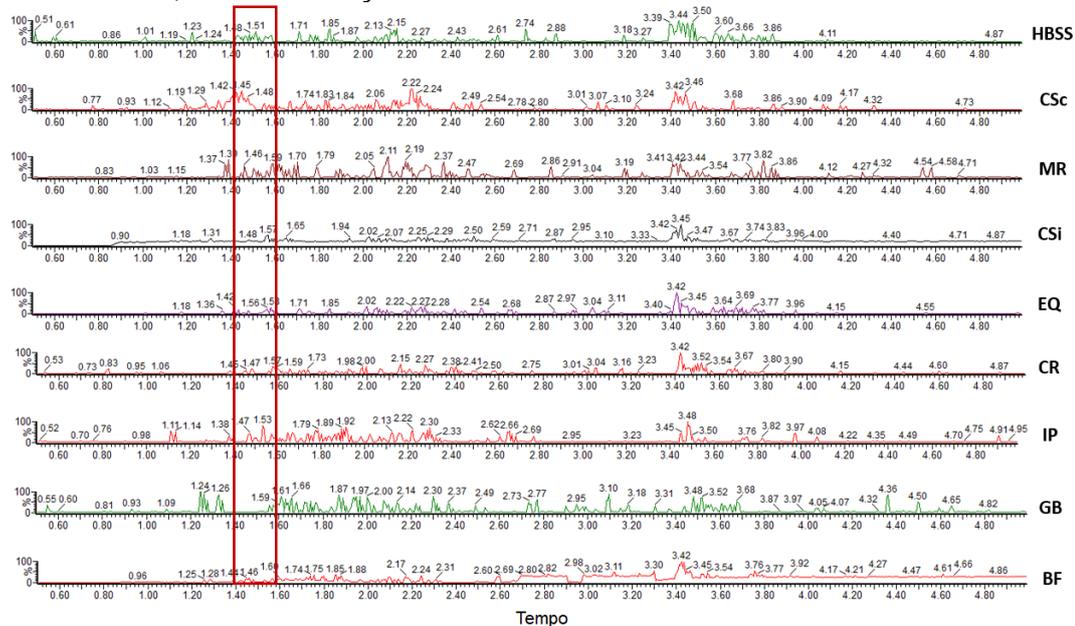
A - Quinidina MRM, ESI +. Transição 325 > 81.



B - Sulfassalazina MRM, ESI +. Transição 399 > 223.

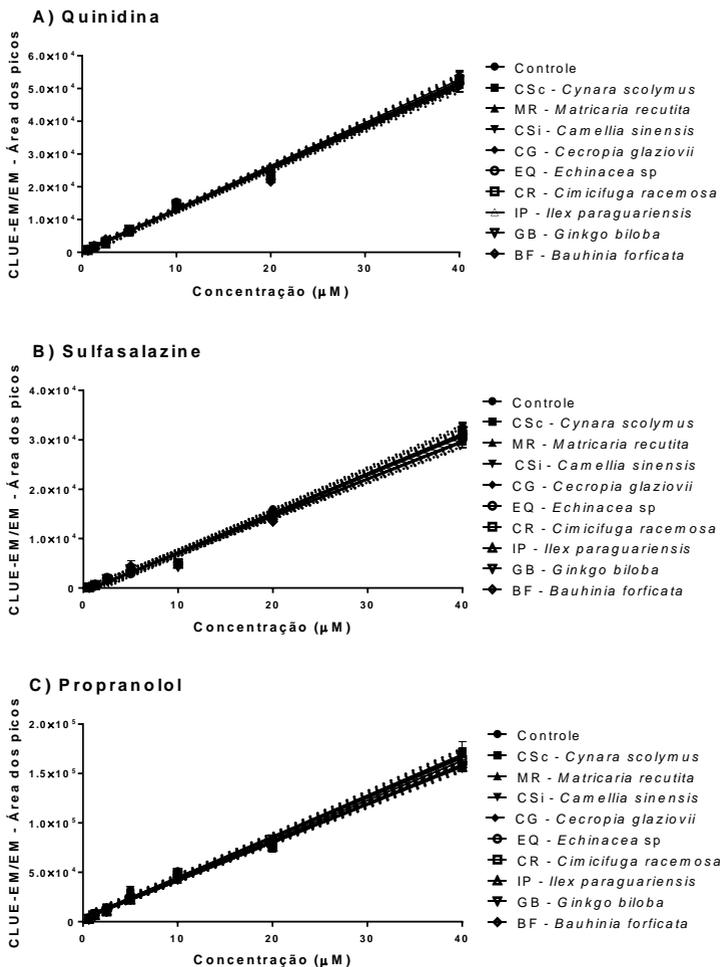


C - Propranolol MRM, ESI +. Transição 260 > 98.



Dados representados em área relativa dos picos (%) versus tempo (min). O quadrante demarca o tempo de retenção característico para cada fármaco marcador (**A**) quinidina 1,08 min, transição 325 > 81; (**B**) sulfasalazina 1,72 min, transição 399 > 223; (**C**) propranolol 1,56 min, transição 260 > 98. **CSc** - *Cynara scolymus*; **MR** - *Matricaria recutita*; **CSi** - *Camellia sinensis*; **CG** - *Cecropia glaziovii*; **EQ** - *Echinacea* sp.; **CR** - *Cimicifuga racemosa*; **IP** - *Ilex paraguariensis*; **GB** - *Ginkgo biloba*; **BF** - *Bauhinia forficata*, **HBSS** – tampão HBSS.

Figura III. 10 - Curvas de quantificação dos fármacos marcadores para determinação do efeito matriz.



Dados apresentados em concentração dos analitos (μM) versus área absoluta dos picos cromatográficos. Cada reta corresponde a um extrato fortificado com o analito (A) quinidina, (B) sulfassalazina, (C) propranolol em diferentes concentrações. Como controle foi utilizado o tampão HBSS pH 6,5. Os dados foram analisados por regressão linear e por comparação dos coeficientes angulares de cada reta com a reta controle.

A robustez do método foi avaliada por modificações deliberadas em parâmetros que poderiam influenciar na quantificação das amostras. A verificação foi efetuada por método univariado, ou seja, por alteração de um parâmetro por vez. Para o estudo foram aplicadas modificações desde o processo de preparo da amostra até o procedimento final de quantificação (Quadro III. 4).

A alteração do material dos filtros utilizados para a preparação da amostra não gerou modificações significativas na quantificação dos analitos. Variações nas condições cromatográficas também não tiveram impacto significativo na quantificação dos fármacos marcadores, mesmo com troca do tipo de coluna, visto que normalmente os testes são efetuados apenas com lotes diferentes de colunas com mesmas características (BRASIL, 2017). Dos parâmetros analisados, apenas variações na temperatura de dessolvatação afetaram a quantificação dos fármacos. Entretanto, foram aplicadas mudanças de $\pm 10\%$ na temperatura, o que gerou uma variação de $\pm 45^\circ\text{C}$ em relação a temperatura ótima estabelecida. Sendo assim, o método foi considerado robusto o suficiente para os testes aqui efetuados. Os dados obtidos para a temperatura de dessolvatação ressaltam a importância de se monitorar adequadamente essa temperatura para utilização deste método desenvolvido para outros estudos.

Análises específicas de estabilidade não foram efetuadas, porém foram quantificados controles diários com amostras dos fármacos nos níveis de alta, média e baixa concentrações. Esses controles foram preparados a partir de uma solução estoque armazenada a 4°C e variações consideráveis não foram observadas no decorrer do tempo de utilização (dados não mostrados). De qualquer modo, estudos prévios já comprovaram a boa estabilidade dos fármacos em estudos (KORANI; DOSHI, 2016; LERKIATBUNDIT, 1993; SAINI; BANSAL, 2014).

Os resultados de validação do método de CLUE-EM/EM desenvolvido foram satisfatórios para a quantificação dos fármacos marcadores e para a finalidade analítica proposta. Uma vantagem relevante do método é a detecção simultânea dos fármacos marcadores em uma única análise, gerando flexibilidade metodológica para diferentes utilizações.

Quadro III. 4 - Resultados da análise de robustez do método de CLUE-EM/EM desenvolvido.

Preparação da amostra		Condições cromatográficas				Condições espectrométricas	
	Filtro*	Fluxo 0,450 mL/min	Fluxo 0,550 mL/min	Coluna C ₁₈ **	Ácido 0,15%***	Dessolvatação 405°C	Dessolvatação 495°C
Quinidina	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
Sulfassalazina	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
Propranolol	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não

* Filtro Millex-GV 13 mm PVDF – Millipore.

** Coluna Acquity UPLC® HSS C₁₈ SB (2.1 x 50 mm, 1.8 µm).

*** Concentração de ácido fórmico nas fases móveis A e B 0,15%.

O método desenvolvido pode ser útil para a aplicação em outros estudos de interações medicamentosas, interações com produtos naturais ou alimentos envolvendo transporte de substratos. O uso de um único método, mesmo que para executar análises independentes de cada marcador por corrida cromatográfica, resulta em economia de tempo (na preparação de eluentes, programação do equipamento e condicionamento da coluna), comparativamente à utilização de métodos diferentes para a análise dos marcadores isoladamente.

Finalizado o processo de validação, foram analisadas as amostras dos ensaios de transporte bidirecional com células Caco-2 conforme descrito a seguir.

3.5 Interações entre plantas medicinais e fármacos avaliados no modelo *Transwell* com células Caco-2

De acordo com o guia do sistema de classificação biofarmacêutica do FDA (2012), a permeabilidade intestinal de fármacos pode ser avaliada por perfusão intestinal *in vivo*, estudos *in silico*, e modelos *in vitro*, com o uso ou não de culturas celulares em monocamada. Mais recentemente, grupos de pesquisa têm mostrado interesse em aplicar as células Caco-2 para estudos de interações entre plantas medicinais e fármacos (FONG et al., 2013; FUNG et al., 2012; HAVENGA et al., 2018; LI et al., 2014; MAZZARI et al., 2016; THORMANN et al., 2015).

O sistema com células Caco-2 é muito popular, sendo um dos modelos mais utilizados para a predição de permeabilidade intestinal em humanos, exatamente por fornecer resultados *in vitro* que se correlacionam bem com o que acontece *in vivo*. Como esse sistema utiliza células de adenocarcinoma de cólon humano, os transportadores expressos, após a diferenciação *in vitro*, têm afinidade por substratos e atividade similares ao que ocorre *in vivo* (AWORTWE; FASINU; ROSENKRANZ, 2014; LI, 2001). Essas características estimulam o uso deste modelo para estudo de interações, visto que a seletividade e a atividade dos transportadores são pontos cruciais para a investigação de interações. As desvantagens do uso das células Caco-2 são a baixa expressão de enzimas CYP450 e os problemas de reprodutibilidade interlaboratorial. Contudo, podem ser usados métodos de investigação associados ao ensaio com células Caco-2 para avaliação do metabolismo/biotransformação enzimática (Capítulo IV). Além disso, quando bem estabelecidos e validados, os estudos de permeabilidade com células Caco-2 têm mostrado boa reprodutibilidade (HAYESHI et al., 2008; KRATZ, 2011; VAN BREEMEN; LI, 2005).

A seguir serão discutidos separadamente os resultados obtidos nos ensaios de transporte bidirecional com os fármacos quinidina e sulfasalazina utilizando o modelo *Transwell* com células Caco-2.

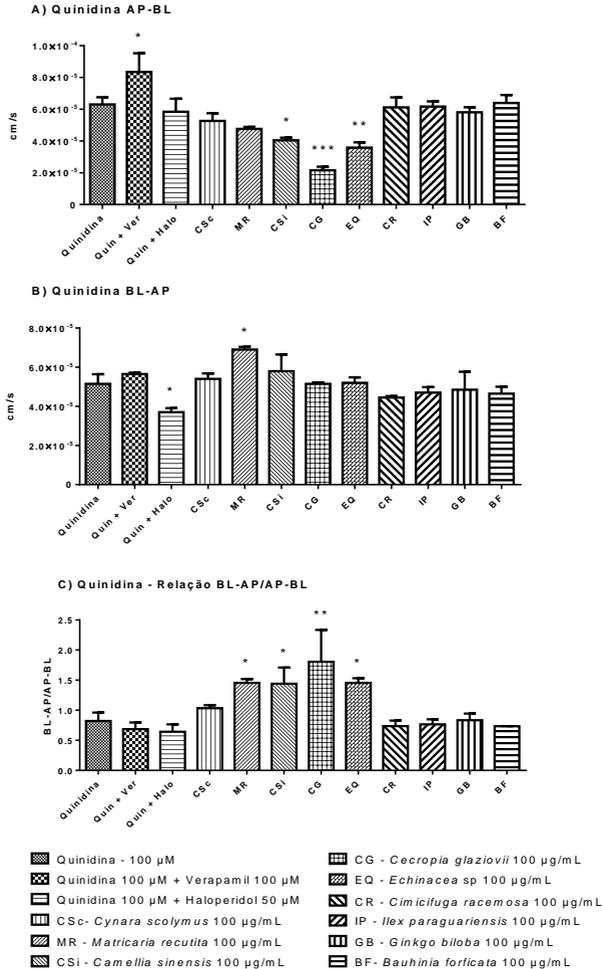
3.5.1 Modulação do transporte bidirecional do fármaco quinidina pelos extratos das plantas medicinais em estudo

O fármaco quinidina é um alcaloide quinolínico isômero do fármaco quinina, composto extraído das cascas das plantas do gênero *Cinchona* (Rubiaceae), nativas da América do Sul. Esse fármaco é usado como antiarrítmico, por atuar bloqueando os canais de sódio e de potássio, reduzindo a excitabilidade dos músculos esquelético e cardíaco e a força de contração cardíaca. A quinidina também é utilizada como antimalárico, sendo duas a três vezes mais potente que a quinina. O mecanismo de ação parece ocorrer pela inibição da polimerização da hematina tóxica, formada pela degradação da hemoglobina nos eritrócitos, gerando efeito tóxico ao parasita (KIM et al., 2016; SANTOS; REICHERT; SANTOS, 2017). A quinidina é um substrato da P-gp e atua também como inibidor da enzima CYP2D6, sendo utilizada em estudos farmacocinéticos e de transporte *in vitro* como fármaco marcador ou agente inibidor (CHO et al., 2014; FDA, 2016; PATIL et al., 2011). Esse fármaco é prontamente absorvido *in vivo* (> 80%), com ampla distribuição pelos tecidos corporais (SANTOS et al., 2017).

A quinidina teve a permeabilidade e o efluxo avaliados tanto isoladamente como em combinação com os extratos das plantas medicinais e com os inibidores da P-gp escolhidos. Como pode ser verificado na Figura III. 11A, os extratos CSi ($p < 0,05$), CG ($p < 0,0001$) e EQ ($p < 0,01$) inibiram significativamente a permeabilidade da quinidina. Um aumento significativo do efluxo foi observado no tratamento com o extrato MR ($p < 0,05$) e também redução do efluxo no tratamento com haloperidol ($p < 0,05$) (Figura III. 11B). Essas modulações geraram variações na relação BL-AP/AP-BL para os extratos MR ($p < 0,05$), CSi ($p < 0,05$), CG ($p < 0,01$) e EQ ($p < 0,05$) (Figura III. 11C).

O FDA sugere uma relação de $P_{app} \text{ BL-AP/AP-BL} \geq 2$ para caracterização de efluxo em estudos de transporte de fármacos (FDA, 2012). Para a quinidina, a média da relação para os tratamentos aplicados foi menor que 2. Isso indica a ausência de efluxo ou um efluxo muito baixo do substrato, que pode ter sido causada pela concentração de quinidina aplicada.

Figura III. 11 - Modulação da P_{app} (cm/s) da quinidina pelos extratos das plantas medicinais em estudo.



(A) P_{app} (cm/s) da quinidina no sentido AP-BL. (B) P_{app} (cm/s) da quinidina no sentido BL-AP. (C) Relação da P_{app} (cm/s) BL-AP/AP-BL. Os dados foram analisados por ANOVA uma via com pós-teste de Dunnett e intervalo de confiança de 95%. As análises são referentes a ao menos dois experimentos independentes. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), **** ($p < 0,0001$).

Dependendo da concentração, a quinidina pode ser substrato ou inibidor da P-gp (SRIVALLI; LAKSHMI, 2012). Neste trabalho, a concentração usada da quinidina pode ter inibido essa proteína de efluxo, o que justificaria a baixa relação de P_{app} e as variações do efeito inibitório sobre a P-gp detectadas para os fármacos haloperidol e verapamil em relação ao controle.

A quinidina, em altas concentrações, e o verapamil são inibidores competitivos reversíveis da P-gp; por esse motivo, foram efetuados testes adicionais com o fármaco haloperidol (50 μM), o qual não é substrato da P-gp, mas atua como inibidor, para verificar se a competição poderia estar prejudicando o resultado inibitório final (IWAKI et al., 2006; NETSOMBOON et al., 2016). Embora tenha sido observada uma redução significativa no efluxo da quinidina ($p < 0,05$), quando em combinação com o haloperidol, não foi detectado aumento na permeabilidade do substrato em comparação ao controle. O haloperidol é um inibidor considerado potente, enquanto a quinidina e o verapamil são inibidores moderados da P-gp, o que justificaria a detecção da inibição do efluxo utilizando o haloperidol, enquanto o mesmo não foi verificado para o verapamil (HOOSAIN et al., 2015; IWAKI et al., 2006).

Em um estudo conduzido por Neuhoff e colaboradores (2003), a quinidina (50 μM - gradiente de pH 6,5/7,4) apresentou P_{app} no sentido AP-BL de aproximadamente 30×10^{-6} cm/s, e no sentido BL-AP de aproximadamente 150×10^{-6} cm/s, com relação da P_{app} BL-AP/AP-BL próxima a 5. Comparando os resultados aqui obtidos com os desse trabalho, verificou-se que a permeabilidade da quinidina ($63,0 \times 10^{-6}$ cm/s) foi maior e que o efluxo ($51,5 \times 10^{-6}$ cm/s) foi menor do que os valores descritos por Neuhoff e colaboradores, reforçando a hipótese de inibição da P-gp pela quinidina.

Independentemente da ocorrência de inibição da P-gp pelo substrato, parte dos extratos reduziram a permeabilidade da quinidina. Os polifenóis (JODOIN; DEMEULE; BELIVEAU, 2002) e as catequinas (WANG; BARECKI-ROACH; JOHNSON, 2002) presentes no extrato de *Camellia sinensis*, bem como o extrato de *Echinacea purpurea* (HANSEN; NILSEN, 2009) possuem atividade inibitória da P-gp já descrita. Todavia, como o efluxo não foi alterado por esses extratos, pode-se sugerir que outros mecanismos, não relacionados à inibição da P-gp, estariam envolvidos na modificação da permeabilidade da quinidina.

O influxo da quinidina é influenciado por modificações de pH, sendo maior em valores de pH mais básicos e pela presença de cátions orgânicos hidrofóbicos (HORIE et al., 2011; ISHIDA; TAKAAI; HASHIMOTO, 2006; MASAGO et al., 2010). Sabe-se que os transportadores de cátions orgânicos (OCT) atuam no influxo da quinidina e são expressos tanto em células LS180 como em células Caco-2, ambas de adenocarcinoma de cólon humano (HAN et al., 2013; ISHIDA et al., 2006; MASAGO et al., 2010). Badolo e colaboradores (2010) demonstraram que os transportadores OCT1 são modulados por um número considerável de fármacos e em concentrações relativamente baixas ($< 20 \mu\text{M}$), indicando a susceptibilidade desses transportadores à regulação por xenobióticos.

Quanto aos produtos de origem natural, os transportadores OCT são reconhecidamente inibidos tanto pelo chá-verde como pela 3-galato de epigalocatequina (KNOP et al., 2015). Assim, a inibição da permeabilidade da quinidina pelos extratos CSi e CG poderia ser atribuída à modificação na atividade de OCT, visto que tanto o extrato CSi como CG são ricos em catequinas (Capítulos II e IV).

Outro composto presente nos extratos de *Camellia sinensis*, *Cecropia glaziovii* e *Echinacea* sp. é o flavonoide quercetina, substrato do transportador OCT1 (Capítulo II) (ERENLER et al., 2015; GLAESER et al., 2014; MASAGO et al., 2010). Logo, parte da inibição da permeabilidade da quinidina pode ter ocorrido também devido à competição pelo transportador entre as moléculas do fármaco e desse composto presente nos extratos.

Entre os extratos testados, o único que apresentou efeito sobre o efluxo foi o extrato MR. A inibição do efluxo pela quinidina parece ter sido revertida/atenuada pelo extrato MR. Esse efeito observado pode estar associado à modulação da atividade da P-gp pelo ácido rosmarínico, um dos fitoconstituintes da *Matricaria recutita* (Capítulo II). No trabalho de Wu e colaboradores (2016) com células HepG2, foi verificada a indução da atividade da P-gp pelo ácido rosmarínico. Segundo os autores, a indução da P-gp ocorreu por um aumento dos níveis de ATP intracelular gerado pelo tratamento com esse composto. Esse dado alerta para a necessidade de uma investigação mais detalhada dessa possível interação, pois a camomila é muito usada por pacientes em quimioterapia para o tratamento das lesões e irritações da mucosa oral (mucosite), vômitos e náuseas (ARDAKANI et al., 2016;

SANAATI et al., 2016), o que poderia estar causando um aumento da resistência ao tratamento com antitumorais efluxados pela P-gp.

Devido ao aparente efeito inibidor exercido pela quinidina, não há como afirmar que os demais extratos não modulam o efluxo via P-gp. Uma investigação mais minuciosa, utilizando diferentes substratos ou outras concentrações da quinidina, precisam ser testadas para que conclusões possam ser obtidas.

Uma das dificuldades de se estudar o transporte de fármacos é o reduzido número de compostos com afinidade específica às proteínas de transporte (BADOLO et al., 2010). Sustentando essa afirmação está o próprio exemplo com o fármaco quinidina aqui apresentado. Embora análises mais amplas sejam necessárias, os testes efetuados permitem inferir que o uso da quinidina no modelo celular empregado pode ser uma ferramenta interessante para avaliar o influxo de fármacos via OCT1, visto que a quinidina não apresentou citotoxicidade na concentração aplicada, pode ser solubilizada facilmente no tampão de aplicação, e aparentemente inibiu o efluxo via P-gp, contornando os principais problemas encontrados em estudos com transportadores, inclusive com os OCTs (FREDLUND; WINIWARTER; HILGENDORF, 2017).

Como conclusão, pode-se constatar variações na permeabilidade e no efluxo gerada pelo tratamento com os extratos, o que reforça a possibilidade de interações entre plantas medicinais e fármacos *in vivo*. Ainda, é sugerida a participação de um importante transportador de influxo (OCT1) na ocorrência dessas interações, o qual atua no transporte de fármacos como lamivudina, zalcitabina e metformina (LOZANO et al., 2018).

3.5.2 Modulação do transporte bidirecional do fármaco sulfassalazina pelos extratos das plantas medicinais em estudo

A sulfassalazina é um ácido aminosalicílico sintético de baixa permeabilidade, altamente efluxado pela BCRP, apresentando permeabilidade < 15% *in vivo* (DAHAN; AMIDON, 2009; MOLS; DEFERME; AUGUSTIJNS, 2005). Esse pró-fármaco é metabolizado por bactérias intestinais gerando seus metabolitos ativos, o ácido sulfamida 5-aminosalicílico e o ácido salicílico, que possuem atividade anti-inflamatória. Aparentemente, os metabolitos atuam inibindo a cicloxigenase e a produção de

prostaglandinas, embora o exato mecanismo de ação ainda seja desconhecido. Devido ao seu efeito anti-inflamatório, a sulfassalazina é utilizada no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, tal como a doença de Crohn, e de doenças reumatoides (KIM et al., 2016; MICROMEDEX, 2018). Em estudos farmacocinéticos, a sulfassalazina é utilizada como substrato da BCRP (KUSUHARA et al., 2012; MOLS et al., 2005; TOMARU et al., 2013).

Neste trabalho, foi avaliada a permeabilidade e o efluxo da sulfassalazina tanto isoladamente como em combinação com os extratos das plantas medicinais em estudo e com a curcumina. Os dados obtidos podem ser visualizados na Figura III. 12.

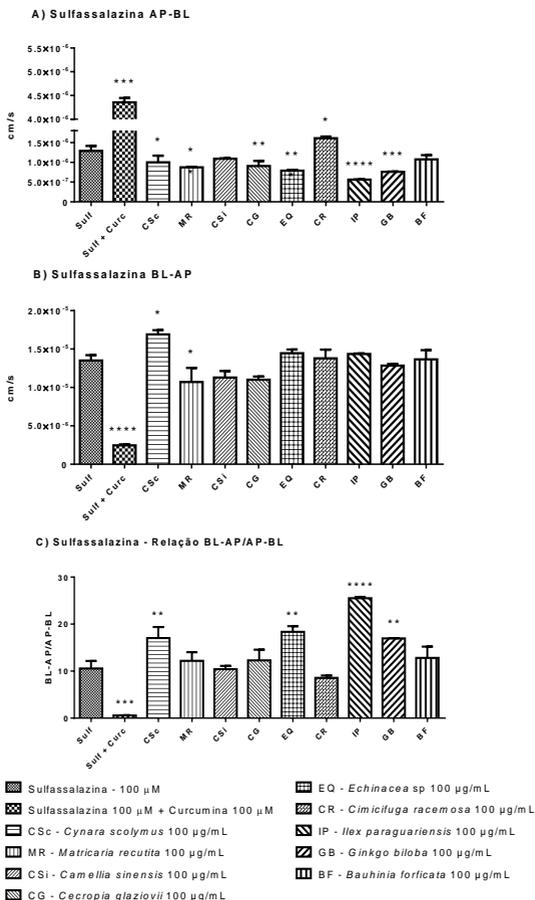
Foi detectada redução na permeabilidade da sulfassalazina causada pelos extratos CSc ($p < 0,05$), MR ($p < 0,01$), CG ($p < 0,01$), EQ ($p < 0,001$), IP ($p < 0,0001$) e GB ($p < 0,001$), e aumento da permeabilidade do substrato causada pelo extrato CR ($p < 0,05$), comparativamente ao controle. A maioria dos tratamentos não alterou significativamente o efluxo da sulfassalazina ($p > 0,05$), exceto os extratos CSc ($p < 0,05$) e MR ($p < 0,05$), que aumentou e reduziu, respectivamente, o efluxo do fármaco marcador.

Ao contrário do verificado com a quinidina, a relação da P_{app} BL-AP/AP-BL da sulfassalazina está consideravelmente acima do limite mínimo estabelecido pelo FDA (relação ≥ 2) para a caracterização de efluxo (FDA, 2012). Os altos valores obtidos indicam que a sulfassalazina foi fortemente efluxada, o que sugestivamente ocorre via BCRP. A modulação do transporte da sulfassalazina pela curcumina, composto inibidor de BCRP, é bem conhecida e verificada tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* (KARIBE et al., 2018; KUSUHARA et al., 2012). Nos ensaios executados, a curcumina gerou um aumento na permeabilidade da sulfassalazina ($p < 0,0001$) e uma redução significativa no seu efluxo ($p < 0,001$), com uma relação de P_{app} BL-AP/AP-BL < 2 para este tratamento, ou seja, inibição efetiva do efluxo.

O efluxo da sulfassalazina pela P-gp já foi investigado em alguns trabalhos e sua participação no transporte desse fármaco foi descartada conforme dados da literatura (DAHAN; AMIDON, 2009; MOLS et al., 2005). Confirmando a participação da BCRP no transporte da sulfassalazina, existem alguns trabalhos, como o de Kaiser e colaboradores (2017), que demonstraram que a

inibição da BCRP com o inibidor específico Ko143 reduziu o efluxo da sulfassalazina.

Figura III. 12 - Modulação da P_{app} (cm/s) da sulfassalazina pelos extratos de plantas medicinais em estudo.



(A) P_{app} (cm/s) da sulfassalazina no sentido AP-BL. (B) P_{app} (cm/s) da sulfassalazina no sentido BL-AP. (C) Relação da P_{app} BL-AP/AP-BL. Os dados foram analisados por ANOVA uma via com pós-teste de Dunnett e intervalo de confiança de 95%. As análises são referentes a ao menos dois ensaios independentes. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) **** ($p < 0,0001$).

A permeabilidade da sulfassalazina em células Caco-2 é conhecidamente menor que o efluxo, ocorrendo de forma polarizada no sentido BL-AP. Em outros trabalhos (KEISER et al., 2017; MOLS et al., 2005), o valor de P_{app} foi aproximadamente 10 vezes maior no sentido BL-AP do que no AP-BL, similarmente ao observado neste trabalho, no qual o valor da P_{app} AP-BL foi de $1,29 \times 10^{-6}$ cm/s e no sentido BL-AP de $13,5 \times 10^{-6}$ cm/s. A predominância do efluxo da sulfassalazina é observada não apenas em células Caco-2, mas também em células saudáveis do intestino humano (KEISER et al., 2017).

Em resumo, a sulfassalazina foi altamente efluxada na concentração testada e o inibidor atuou modulando o transporte bidirecional; porém, para a maioria dos extratos que apresentou variação significativa na permeabilidade não se observou modulação do efluxo. Com base nos dados, é possível sugerir que outros transportadores estariam atuando na modulação do transporte da sulfassalazina, além da BCRP.

A participação da proteína de efluxo MRP2 no transporte da sulfassalazina é sugerida na literatura, bem como a dos transportadores de influxo OATP (DAHAN; AMIDON, 2009; TOMARU et al., 2013). Aparentemente, o transportador MRP2 não foi o responsável pela mudança na permeabilidade do fármaco marcador, visto que da mesma forma que para a BCRP, não ocorreu modificação no efluxo do substrato para a maioria dos tratamentos. Logo, poderia ser considerada a modulação de algum transportador de influxo pelos extratos testados.

Estudos indicam que a sulfassalazina é um substrato dos transportadores de influxo OATP2B1 (KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009; KASHIHARA et al., 2017; KUSUHARA et al., 2012). Recentemente Keiser e colaboradores (2017) mostraram que a inibição de OATP2B1 reduziu significativamente a relação da P_{app} BL-AP/AP-BL da sulfassalazina, indicando que os OATP2B1 têm um papel importante no transporte desse fármaco *in vitro*. A modulação do OATP2B1 pela curcumina também foi relatada (KONDO et al., 2017), o que poderia, em conjunto com a inibição da BCRP por esse composto, reforçar os resultados da modulação da P_{app} observada neste trabalho.

Considerando os dados descritos, e o fato de que o transportador OATP2B1 é expresso em células Caco-2 em maior abundância, até mesmo que a do transportador de efluxo P-gp (MATSSON et al., 2015; OLANDER et al., 2016), pode-se sugerir

que a redução da permeabilidade da sulfassalazina foi gerada pela inibição desse transportador.

Alguns produtos naturais são conhecidamente moduladores de OATP2B1. Um estudo com extratos de plantas da medicina tradicional japonesa Kampo demonstrou que diversos extratos, na concentração de 100 µg/mL, apresentaram efeito inibidor de OATP2B1 (IIJIMA et al., 2018). A modulação desses transportadores também foi verificada utilizando compostos isolados de origem natural, tais como quercetina, rutina, vitexina, e ácido clorogênico (KONDO et al., 2017; WEN et al., 2016).

Apesar do extrato CSc ter induzido o efluxo da sulfassalazina, o que justificaria a redução na permeabilidade deste fármaco, a inibição dos transportadores OATP2B1 pode ter contribuído para a diminuição na permeabilidade, visto que um dos compostos do extrato de *Cynara scolymus*, a cinarina, é inibidor do OATP2B1 (ZHANG et al., 2014). A cinarina está presente inclusive no extrato de *Echinacea* sp., extrato que também reduziu a permeabilidade da sulfassalazina (BROWN et al., 2011). A inibição dos transportadores OATP2B1 pelo extrato de *Echinacea purpurea* já foi demonstrada por Fuchikami e colaboradores (2006), confirmando os dados aqui obtidos com o extrato EQ.

A redução da permeabilidade da sulfassalazina pelos outros extratos testados sugestivamente também envolve os transportadores OATP2B1. Sabe-se que compostos fenólicos são inibidores importante dos transportadores OATP2B1 (KONDO et al., 2017). Por exemplo, a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é rica em compostos fenólicos (FRIZON et al., 2015) e o extrato IP foi o que inibiu de forma mais expressiva a permeabilidade da sulfassalazina. Além disso, a inibição de OATP2B1 pelo extrato de *Ginkgo biloba* já foi descrita na literatura (FUCHIKAMI et al., 2006). Desta forma, o mesmo pode ter ocorrido com o extrato GB, que também é rico em compostos fenólicos, em especial os flavonoides quercetina e canferol (KOBUS et al., 2009), ambos inibidores de OATP2B1 (KOBUS et al., 2009; KONDO et al., 2017).

As catequinas também inibem os OATP2B1 (FUCHIKAMI et al., 2006; IIJIMA et al., 2018). Sabendo que a embaúba (*Cecropia glaziovii*) possui catequinas, a redução da permeabilidade da sulfassalazina pelo extrato CG pode ser resultante da ação desses compostos sobre os transportadores OATP2B1. A vitexina, outro componente de *Cecropia glaziovii*, também inibiu OATP2B1,

conforme relatado por Wen e colaboradores (2016), indicando que outros compostos poderiam atuar conjuntamente com as catequinas causando o resultado final detectado.

Entretanto, os dados obtidos com outros extratos testados sugerem que a modulação de OAT2B1 pode não ter sido determinante ou ser a via isolada de atuação dos extratos. Como exemplo, pode-se citar que o extrato de chá-verde (CSi), que é rico em compostos fenólicos, inclusive catequinas (FERRERES et al., 2012; PEREIRA et al., 2014), e o extrato de pata-de-vaca (BF), também rico em compostos fenólicos (FERRERES et al., 2012), não alteraram o transporte da sulfassalazina. Ainda, a inibição de OATP2B1 pelo extrato de *Cimicifuga racemosa*, em concentrações relativamente baixas (40 µg/mL), já foi descrita (FUCHIKAMI et al., 2006), embora nesta Tese esse extrato tenha induzido a permeabilidade da sulfassalazina.

Nas situações em que os resultados foram divergentes ou diferentes do esperado, deve-se considerar: (1) a complexidade de cada extrato; (2) a concentração ou predominância de cada composto ou grupo de compostos no extrato; (3) a afinidade dos compostos com os transportadores, como exemplo o próprio transportador OATP2B1, que possui múltiplos sítios de ligação, resultando em diferentes características de reconhecimento dos substratos e moduladores (HOSHINO et al., 2016); e (4) a ação por outras vias que atenuam o efeito de uma via em específico.

O único extrato que inibiu significativamente o efluxo da sulfassalazina foi o extrato da camomila (MR) ($p < 0,05$), o qual possui em sua composição os flavonoides quercetina, canferol e apigenina (HAGHI et al., 2014). Um trabalho que avaliou inúmeros flavonoides comprovou que esses compostos inibem a BCRP em células MDCK-BCRP e MCF-7 MX, com valores de IC_{50} relativamente baixos ($< 10 \mu M$) (PICK et al., 2011). Além de atuarem como inibidores, a quercetina e o canferol são substratos da BCRP (AN; GALLEGOS; MORRIS, 2011), podendo então ter competido pelo transportador com a sulfassalazina.

Como pode ser observado na Figura III. 12B, o extrato de chá-verde (CSi) reduziu, embora não significativamente, o efluxo da sulfassalazina. Essa pequena redução pode ter sido resultado da ação competitiva da quercetina e/ou do canferol pelo transportador BCRP, visto que esse extrato possui esses flavonoides em sua composição (Capítulo IV) (HAGHI et al., 2014). A inibição da BCRP pelo composto 3-galato de epigallocatequina, também

presente no chá-verde foi confirmada por Farabegoli e colaboradores (2010), porém com uma concentração relativamente alta do composto (100 µg/mL). Assim sendo, o teor deste composto no extrato CSi pode não ter sido suficiente para gerar o efeito inibitório descrito.

Ao contrário dos demais extratos testados, o extrato de erva-de-são-cristóvão (CR) aumentou a permeabilidade da sulfassalazina, sem alterar significativamente o efluxo desse fármaco. A inibição da BCRP por *Cimicifuga racemosa* já foi descrita na literatura (TAMAKI et al., 2010), contudo, a concentração testada foi 10 vezes maior do que a concentração usada neste trabalho. Outros compostos, tais como o ácido cafeico e outros estruturalmente muito semelhantes ao ácido clorogênico, são encontrados em *Cimicifuga racemosa* (LI et al., 2003), e conforme descrito por Wen e colaboradores (2016), o ácido clorogênico é indutor de OATP2B1. Assim, o aumento da permeabilidade da sulfassalazina pelo extrato CR pode ter ocorrido por indução desse transportador pelos compostos estruturalmente semelhantes ao ácido clorogênico presentes nesta planta medicinal.

Os dados obtidos sugerem que a maior participação na modulação da permeabilidade da sulfassalazina não se refere ao efluxo via BCRP, mas sim possivelmente à regulação do transportador de influxo OATP2B1 pelos extratos aqui testados. Mais estudos são necessários para a confirmação desse mecanismo, bem como estudos *in vivo* para a determinação dos efeitos dessas interações na clínica. Contudo, por serem expressos em diversos tecidos, e pelo fato de que muitos fármacos, tais como as estatinas e a glibenclâmida, serem substrato desses transportadores, a ocorrência dessas interações *in vivo* pode ser de grande relevância clínica (KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009; YU et al., 2017).

4. CONCLUSÃO

O método analítico por CLUE-EM/EM desenvolvido e validado para a quantificação simultânea dos fármacos quinidina, sulfassalazina e propranolol pode ser útil para estudos de interações medicamentosas com outros produtos de origem natural, estudos de metabolismo e de mecanismos de transporte de fármacos, ou demais investigações que necessitem da

quantificação dos fármacos em questão. A verificação simultânea desses fármacos gera flexibilidade metodológica para os empregos sugeridos.

Os resultados obtidos nos ensaios de interação entre plantas medicinais e fármacos demonstram que a utilização de um único substrato e de inibidores considerados específicos pode não ser suficiente para conclusões definitivas. A dificuldade, em parte, está associada aos complexos e amplos mecanismos das interações plantas medicinais-fármacos, além da carência de informações para sustentar e discutir os resultados encontrados. Este estudo ressaltou a importância da escolha adequada, tanto dos fármacos marcadores como dos inibidores e, principalmente, das concentrações dos fármacos e extratos utilizados, visto que modificações sutis reorganizam as respostas celulares e reduzem a especificidade da estratégia metodológica aplicada.

Observou-se que os extratos utilizados geram interações *in vitro*, as quais devem ser investigadas *in vivo* e que os transportadores de influxo podem ter um papel determinante na farmacocinética e nas interações. Ressalta-se, assim, a necessidade da avaliação da atividade dos transportadores de influxo durante o desenvolvimento de novos fármacos, como já foi sugerido às autoridades regulatórias (LU, XIAOXI et al., 2014).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, I. M. et al. Isoflavones in food supplements: chemical profile, label accordance and permeability study in Caco-2 cells. **Food Funct**, v. 6, n. 3, p. 938-46, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653232> >.

AN, G.; GALLEGOS, J.; MORRIS, M. E. The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abcg2-mediated quercetin efflux. **Drug Metab Dispos**, v. 39, n. 3, p. 426-32, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21139040> >.

ARDAKANI, M. T. et al. Evaluating the effect of *Matricaria recutita* and *Mentha piperita* herbal mouthwash on management of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A randomized, double blind, placebo controlled clinical trial. **Complement Ther Med**, v. 29, p. 29-34, 2016.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27912953> >.

AWORTWE, C.; FASINU, P. S.; ROSENKRANZ, B. Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges. **J Pharm Pharm Sci**, v. 17, n. 1, p. 19, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735758> >.

BADOLO, L. et al. Screening of OATP1B1/3 and OCT1 inhibitors in cryopreserved hepatocytes in suspension. **Eur J Pharm Sci**, v. 40, n. 4, p. 282-8, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381614> >.

BANSAL, T. et al. Concurrent determination of topotecan and model permeability markers (atenolol, antipyrine, propranolol and furosemide) by reversed phase liquid chromatography: utility in Caco-2 intestinal absorption studies. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 859, n. 2, p. 261-6, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936093> >.

BOCK, U.; FLOTOTTO, T.; HALTNER, E. Validation of cell culture models for the intestine and the blood-brain barrier and comparison of drug permeation. **ALTEX**, v. 21 Suppl 3, p. 57-64, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057409> >.

BOGACZ, A. et al. The influence of soybean extract on the expression level of selected drug transporters, transcription factors and cytochrome P450 genes encoding phase I drug-metabolizing enzymes. **Ginekol Pol**, v. 85, n. 5, p. 348-53, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25011215> >.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil: Ministério da Saúde, 2017. 22 p.

BROWN, P. N. et al. Determination of major phenolic compounds in *Echinacea* spp. raw materials and finished products by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation matrix extension. **J AOAC Int**, v. 94, n.

5, p. 1400-10, 2011. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22165004> >.

CHO, D. Y. et al. Selective inhibition of cytochrome P450 2D6 by Sarpogrelate and its active metabolite, M-1, in human liver microsomes. **Drug Metab Dispos**, v. 42, n. 1, p. 33-9, 2014. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167220> >.

CYPROTEX. **Caco-2 permeability assay**: Cyprotex 2018. Disponible em: < <https://www.cyprotex.com/adme/k/in-vitro-permeability/caco-2-permeability/> >.

DAHAN, A.; AMIDON, G. L. Small intestinal efflux mediated by MRP2 and BCRP shifts sulfasalazine intestinal permeability from high to low, enabling its colonic targeting. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 297, n. 2, p. G371-7, 2009. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541926> >.

_____. MRP2 mediated drug-drug interaction: indomethacin increases sulfasalazine absorption in the small intestine, potentially decreasing its colonic targeting. **Int J Pharm**, v. 386, n. 1-2, p. 216-20, 2010. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944137> >.

DO, K. et al. Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Hexane Extracts Inhibit Cellular Fatty Acid Uptake by Reducing the Expression of Fatty Acid Transporters. **Food Sci Biotechnol**, v. 20, n. 1, p. 6, 2011. Disponible em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10068-011-0032-7> >.

ERENLER, R. et al. Chemical constituents, quantitative analysis and antioxidant activities of *Echinacea purpurea* (L.) Moench and *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 2015, p. 9, 2015. Disponible em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jfbc.12168> >.

FARABEGOLI, F. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates Pg-P and BCRP in a tamoxifen resistant MCF-7 cell

line. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 356-62, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20149610> >.

FDA (Food and Drug Administration). **Guidance for Industry: Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations**. U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration, 2012. 79 p.

_____. **Drug Development and Drug Interactions**. United States: U. S. Department of Health and Human Service 2016. Disponível em: < <https://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/developmentresources/druginteractionslabeling/ucm080499.htm> >.

FERRERES, F. et al. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: relation with their biological properties. **Food Chem**, v. 134, n. 2, p. 894-904, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23107705> >.

FERRUZZA, S. et al. A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. **Toxicol in Vitro**, v. 26, n. 8, p. 1252-5, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22265977> >.

FONG, S. Y. et al. Establishing the pharmaceutical quality of Chinese herbal medicine: a provisional BCS classification. **Mol Pharm**, v. 10, n. 5, p. 1623-43, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23473440> >.

FREDLUND, L.; WINIWARTER, S.; HILGENDORF, C. *In Vitro* Intrinsic Permeability: A Transporter-Independent Measure of Caco-2 Cell Permeability in Drug Design and Development. **Mol Pharm**, v. 14, n. 5, p. 1601-9, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28329446> >.

FRIZON, C. N. T. et al. Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Sci Technol**, v. 60, n. 2015, p. 7, 2015. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814006653> >.

FUCHIKAMI, H. et al. Effects of herbal extracts on the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. **Drug Metab Dispos**, v. 34, n. 4, p. 577-82, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415120> >.

FUNG, W. T. et al. Assessment of extracts from red yeast rice for herb-drug interaction by *in-vitro* and *in-vivo* assays. **Sci Rep**, v. 2, p. 298-304, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389767> >.

GLAESER, H. et al. Organic anion transporting polypeptides and organic cation transporter 1 contribute to the cellular uptake of the flavonoid quercetin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 9, p. 883-91, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24947867> >.

GONCALVES, J. E. et al. Effect of pH, mucin and bovine serum on rifampicin permeability through Caco-2 cells. **Biopharm Drug Dispos**, v. 33, n. 6, p. 316-23, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847250> >.

HAGHI, G. et al. Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV. **Res Pharm Sci**, v. 9, n. 1, p. 31-7, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25598797> >.

HAN, T. K. et al. Organic cation transporter 1 (OCT1/mOct1) is localized in the apical membrane of Caco-2 cell monolayers and enterocytes. **Mol Pharmacol**, v. 84, n. 2, p. 182-9, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680637> >.

HANSEN, T. S.; NILSEN, O. G. *Echinacea purpurea* and P-glycoprotein drug transport in Caco-2 cells. **Phytother Res**, v. 23, n. 1, p. 86-91, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688789> >.

HAVENGA, K. et al. The *In Vitro* and *In Vivo* Effects of Hypoxis hemerocallidea on Indinavir Pharmacokinetics: Modulation of Efflux. **Planta Med**, p. 7, 2018. Disponível em: < <https://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-0607-2743> >

HAYESHI, R. et al. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. **Eur J Pharm Sci**, v. 35, n. 5, p. 383-96, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782614> >.

HEATON, J. et al. Rapid quantification of quinine and its major metabolite (3S)-3-hydroxyquinine in diluted urine by UPLC-MS/MS. **J Pharm Biomed Anal**, v. 55, n. 3, p. 494-9, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377309> >.

HOOSAIN, F. G. et al. Bypassing P-Glycoprotein Drug Efflux Mechanisms: Possible Applications in Pharmaco-resistant Schizophrenia Therapy. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 21, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26491671> >.

HORIE, A. et al. Mechanisms for membrane transport of metformin in human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Biopharm Drug Dispos**, v. 32, n. 5, p. 253-60, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21567399> >.

HOSHINO, Y. et al. Molecular localization and characterization of multiple binding sites of organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) as the mechanism for substrate and modulator dependent drug–drug interaction. **Med. Chem. Commun**, v. 2016, n. 7, p. 8, 2016. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2016/MD/C6MD00235H#!divAbstract> >.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nat Protoc**, v. 2, n. 9, p. 2111-9, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853866> >.

IJIMA, R. et al. Interactions between crude drug extracts used in Japanese traditional Kampo medicines and organic anion-transporting polypeptide 2B1. **J Ethnopharmacol**, v. 214, p. 153-9, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29248449> >.

ISHIDA, K.; TAKAAI, M.; HASHIMOTO, Y. Pharmacokinetic analysis of transcellular transport of quinidine across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 3, p. 522-6, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16508158> >.

IWAKI, K. et al. Haloperidol is an inhibitor but not substrate for MDR1/P-glycoprotein. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, n. 12, p. 1617-22, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331325> >.

JODOIN, J.; DEMEULE, M.; BELIVEAU, R. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. **Biochim Biophys Acta**, v. 1542, n. 1-3, p. 149-59, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11853888> >.

KALLIOKOSKI, A.; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 3, p. 693-705, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19785645> >.

KARIBE, T. et al. Curcumin as an *In Vivo* Selective Intestinal Breast Cancer Resistance Protein Inhibitor in Cynomolgus Monkeys. **Drug Metab Dispos**, v. 46, n. 5, p. 667-79, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29358184> >.

KASHIHARA, Y. et al. Small-Dosing Clinical Study: Pharmacokinetic, Pharmacogenomic (SLCO2B1 and ABCG2), and Interaction (Atorvastatin and Grapefruit Juice) Profiles of 5 Probes for OATP2B1 and BCRP. **J Pharm Sci**, v. 106, n. 9, p. 2688-94, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28322941> >.

KEISER, M. et al. The Organic Anion-Transporting Peptide 2B1 Is Localized in the Basolateral Membrane of the Human Jejunum and Caco-2 Monolayers. **J Pharm Sci**, v. 106, n. 9, p. 2657-63, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28408210> >.

KIM, S. et al. PubChem Substance and Compound databases. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. D1, p. D1202-13, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400175> >.

KNOP, J. et al. Inhibitory Effects of Green Tea and (-)-Epigallocatechin Gallate on Transport by OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K and P-Glycoprotein. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139370, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26426900> >.

KOBUS, J. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of Ginkgo leaves. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**, v. 111, p. 11, 2009. Disponível em: < onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.200800299/pdf >.

KONDO, A. et al. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) 2B1 contributes to the cellular uptake of theaflavin. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 32, n. 2, p. 145-50, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28190756> >.

KORANI, S. M.; DOSHI, D. B. Development and Validation of Stability Indicating HPTLC Method for Simultaneous Estimation of Propranolol Hydrochloride and Flunarizine Dihydrochloride. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 5, n. 7, p. 8, 2016. Disponível em: < <http://www.ijpsonline.com/> >.

KRATZ, J. M. et al. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 6, p. 531-7, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21584437> >.

KUSUHARA, H. et al. Pharmacokinetic interaction study of sulphasalazine in healthy subjects and the impact of curcumin as an *in vivo* inhibitor of BCRP. **Br J Pharmacol**, v. 166, n. 6, p. 1793-

803, 2012. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300367> >.

LANÇAS, F. M. Detectores. In: (Ed.). **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009a. cap. 4, 382 p.

_____. Validação em cromatografia líquida. In: (Ed.). **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009b. cap. 13, 382 p.

LAU, C. et al. Effect of Chinese herbs on CYP3A4 activity and expression *in vitro*. **J Ethnopharmacol**, v. 149, n. 2, p. 543-9, 2013. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23876595> >.

LEE, J. B. et al. Quantitative analysis of lab-to-lab variability in Caco-2 permeability assays. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 114, p. 38-42, 2017. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28088633> >.

LERKIATBUNDIT, S. Stability of quinine dihydrochloride in commonly used intravenous solutions. **J Clin Pharm Ther**, v. 1993, n. 18, p. 3, 1993. Disponível em: <
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2710.1993.tb00600.x> >.

LI, A. P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 6, n. 7, p. 357-66, 2001. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11267922> >.

LI, H. et al. Involvement of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in Caco-2 and MDCKII cells. **Pharm Res**, v. 25, n. 11, p. 2601-12, 2008. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654741> >.

LI, W. et al. Identification of caffeic acid derivatives in *Actea racemosa* (*Cimicifuga racemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun**

Mass Spectrom, v. 17, n. 9, p. 978-82, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717772> >.

LI, X. et al. Inhibitory effects of herbal constituents on P-glycoprotein *in vitro* and *in vivo*: herb-drug interactions mediated via P-gp. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 275, n. 2, p. 163-75, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24380838> >.

LOZANO, E. et al. Genetic Heterogeneity of SLC22 Family of Transporters in Drug Disposition. **J Pers Med**, v. 8, n. 2, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29659532> >.

LU, X. et al. The Interactions of Herbal Compounds with Human Organic Anion/Cation Transporters. **J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics**, v. 5, n. 5, p. 8, 2014. Disponível em: < <https://www.omicsonline.org/open-access/the-interactions-of-herbal-compounds-with-human-organic-anioncation-transporters-2153-0645-5-142.php?aid=38296> >.

MASAGO, M. et al. Membrane transport mechanisms of quinidine and procainamide in renal LLC-PK1 and intestinal LS180 cells. **Biol Pharm Bull**, v. 33, n. 8, p. 1407-12, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20686239> >.

MATSSON, P. et al. A global drug inhibition pattern for the human ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (ABCG2). **J Pharmacol Exp Ther**, v. 323, n. 1, p. 19-30, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616561> >.

MATSSON, P. et al. Quantifying the impact of transporters on cellular drug permeability. **Trends Pharmacol Sci**, v. 36, n. 5, p. 255-62, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25799456> >.

MAZZARI, A. L. et al. *In vitro* Effects of Four Native Brazilian Medicinal Plants in CYP3A4 mRNA Gene Expression, Glutathione Levels, and P-Glycoprotein Activity. **Front Pharmacol**, v. 7, p. 12, 2016. Disponível em: <

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00265/full>
>.

MICROMEDEX, I. **Sulfasalazine**: Truven Health Analytics Inc. 2018.

MOLS, R.; DEFERME, S.; AUGUSTIJNS, P. Sulfasalazine transport in *in-vitro*, *ex-vivo* and *in-vivo* absorption models: contribution of efflux carriers and their modulation by co-administration of synthetic nature-identical fruit extracts. **J Pharm Pharmacol**, v. 57, n. 12, p. 1565-73, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354400> >.

NETSOMBOON, K. et al. Novel *in vitro* transport method for screening the reversibility of P-glycoprotein inhibitors. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 100, p. 9-14, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26692501> >.

NEUHOFF, S. et al. pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. **Pharm Res**, v. 20, n. 8, p. 1141-8, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948010> >.

OLANDER, M. et al. The Proteome of Filter-Grown Caco-2 Cells With a Focus on Proteins Involved in Drug Disposition. **J Pharm Sci**, v. 105, n. 2, p. 817-27, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26869432> >.

PATIL, A. G. et al. Validation of quinidine as a probe substrate for the *in vitro* P-gp inhibition assay in Caco-2 cell monolayer. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v. 36, n. 3, p. 115-9, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725799> >.

PEREIRA, V. P. et al. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of green, black and white teas of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Rev Bras Pl Med**, v. 16, n. 3, p. 9, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000300003 >.

PICK, A. et al. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Bioorg Med Chem**, v. 19, n. 6, p. 2090-102, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21354800> >.

REYNER, E. L. et al. *In vitro* characterization of axitinib interactions with human efflux and hepatic uptake transporters: implications for disposition and drug interactions. **Drug Metab Dispos**, v. 41, n. 8, p. 1575-83, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729661> >.

SAINI, B.; BANSAL, G. Degradation Study on Sulfasalazine and a Validated HPLC-UV Method for its Stability Testing. **Sci Pharm**, v. 82, n. 2, p. 295-306, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959403> >.

SANAATI, F. et al. Effect of Ginger and Chamomile on Nausea and Vomiting Caused by Chemotherapy in Iranian Women with Breast Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 8, p. 4125-9, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27644672> >.

SANTOS, C. A. D. M.; REICHERT, C. L.; SANTOS, T. G. Alcaloides quinolínicos. In: SIMÕES, C. M. O. (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 21, 486 p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. John Wiley & Sons, Inc. , 1997. 800 p.

SRINIVASAN, B. et al. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. **J Lab Autom**, v. 20, n. 2, p. 107-26, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25586998> >.

SRIVALLI, K. M. R.; LAKSHMI, P. K. Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. **Braz J Pharm Sci**, v. 48, n. 3, p. 16, 2012. Disponível em: < www.scielo.br/pdf/bjps/v48n3/a02v48n3.pdf >.

TAKENAKA, T. et al. Application of a Human Intestinal Epithelial Cell Monolayer to the Prediction of Oral Drug Absorption in Humans as a Superior Alternative to the Caco-2 Cell Monolayer. **J Pharm Sci**, v. 105, n. 2, p. 915-24, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26869436> >.

TAMAKI, H. et al. Inhibitory effects of herbal extracts on breast cancer resistance protein (BCRP) and structure-inhibitory potency relationship of isoflavonoids. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 25, n. 2, p. 170-9, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460823> >.

THORMANN, U. et al. Membrane transport of nobiletin conjugation products and use of the extract of *Chamomillae romanae* flos influence absorption of nobiletin in the Caco-2 model. **Eur J Pharm Sci**, v. 70, p. 92-106, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25477003> >.

TOLLE-SANDER, S. et al. Midazolam exhibits characteristics of a highly permeable P-glycoprotein substrate. **Pharm Res**, v. 20, n. 5, p. 757-64, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12751631> >.

TOMARU, A. et al. Studies on the Intestinal Absorption Characteristics of Sulfasalazine a Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Substrate. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 28, n. 1, p. 71-4, 2013. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1347436715303803> >.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 336 p.

TURNER, J. R. et al. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. **Semin Cell Dev Biol**, v. 36, p. 204-12, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25263012> >.

UMEZAWA, H. et al. Simultaneous determination of beta-blockers in human plasma using liquid chromatography-tandem mass

spectrometry. **Biomed Chromatogr**, v. 22, n. 7, p. 702-11, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18318013> >.

VAN BREEMEN, R. B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 1, n. 2, p. 175-85, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16922635> >.

VAN SPAENDONK, H. et al. Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 12, p. 2106-23, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28405139> >.

VILLARROEL, P. et al. Effect of dietary protein on heme iron uptake by Caco-2 cells. **Eur J Nutr**, v. 50, n. 8, p. 637-43, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21327555> >.

WANG, E. J.; BARECKI-ROACH, M.; JOHNSON, W. W. Elevation of P-glycoprotein function by a catechin in green tea. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 297, n. 2, p. 412-8, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12237135> >.

WEN, F. et al. Identification of natural products as modulators of OATP2B1 using LC-MS/MS to quantify OATP-mediated uptake. **Pharm Biol**, v. 54, n. 2, p. 293-302, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25858254> >.

WU, J. et al. *Spica prunellae* and its marker compound rosmarinic acid induced the expression of efflux transporters through activation of Nrf2-mediated signaling pathway in HepG2 cells. **J Ethnopharmacol**, v. 193, p. 11, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27422165> >.

YAMAURA, Y. et al. Functional Comparison of Human Colonic Carcinoma Cell Lines and Primary Small Intestinal Epithelial Cells for Investigations of Intestinal Drug Permeability and First-Pass Metabolism. **Drug Metab Dispos**, v. 44, n. 3, p. 329-35, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700954> >.

YU, J. et al. Intestinal Drug Interactions Mediated by OATPs: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Findings. **J Pharm Sci**, v. 106, n. 9, p. 2312-25, 2017. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28414144> >.

YUAN, S. Y.; RIGOR, R. R. In: (Ed.). **Regulation of Endothelial Barrier Function**. San Rafael (CA). Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease, 2010. 143 p.

ZHANG, Z. Y. et al. Inhibitory effect of medicinal plant-derived carboxylic acids on the human transporters hOAT1, hOAT3, hOATP1B1, and hOATP2B1. **Chin J Nat Med**, v. 12, n. 2, p. 131-8, 2014. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24636064> >.

CAPÍTULO IV

**MODULAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO FÁRMACO
MARCADOR METOPROLOL, VIA ENZIMA CYP2D6, PELOS
EXTRATOS DAS PLANTAS MEDICINAIS EM ESTUDO**

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Este Capítulo apresenta dados sobre a modulação da atividade da enzima CYP2D6 recombinante humana pelos extratos das plantas medicinais em estudo. Para tal finalidade, foram efetuados ensaios *in vitro* utilizando o fármaco marcador metoprolol, conhecido substrato da enzima CYP2D6. O marcador e os metabólitos da reação foram quantificados por CLUE-EM e os extratos ativos caracterizados por CLUE-EM/EM.

Neste Capítulo, os dados são apresentados na forma de um artigo científico, acrescidos de uma breve introdução justificando a escolha da metodologia utilizada para a investigação e de uma discussão resumida dos resultados.

2. INTRODUÇÃO

Como as células Caco-2 não expressam, de forma apreciável, enzimas metabólicas do citocromo P450, modelos alternativos necessitam ser aplicados para os estudos *in vitro* sobre o metabolismo e biotransformação de fármacos (FDA, 2012; SCHMIEDLIN-REN et al., 1997). De acordo com as normas do FDA, para avaliar interações fármaco-fármaco no que diz respeito à biotransformação, podem ser usados modelos *in vitro*, tais como microssomas hepáticos, hepatócitos humanos criopreservados ou frescos, e enzimas recombinantes (FDA, 2012).

Os microssomas hepáticos possuem o inconveniente de permitir a ligação de alguns fármacos na porção não enzimática das proteínas microssomais, gerando resultados inconsistentes. Muitas vezes, eles são comercializados como uma mistura das diferentes enzimas CYP450, não permitindo a análise individualizada de uma única isoenzima, sem o risco de interferências nas reações causadas pelas demais enzimas constituintes (LI, 2001).

A dificuldade de obtenção e preparação de hepatócitos humanos para uso em estudos de metabolismo, assim como a variabilidade na expressão das enzimas CYP450 entre os doadores dos fígados, dificultam sua aplicação (FAHMI; RIPP, 2010; LI, 2001). A cultura de hepatócitos, por sua vez, embora seja um modelo com complexidade metabólica, que mimetiza muito bem o que ocorre *in vivo*, possui desvantagens como a dificuldade de cultivo e a instabilidade fenotípica, alterando a expressão e a

atividade das enzimas nessas células após seu isolamento (CASTELL et al., 2006; TUCKER; HOUSTON; HUANG, 2001).

O uso de enzimas recombinantes para estudos de interação permite uma avaliação mais direcionada do que com o uso de microssomas hepáticos, e não apresenta as limitações das técnicas usando cultura de hepatócitos. Além disso, as enzimas recombinantes são facilmente obtidas, podendo ser adquiridas comercialmente por um custo relativamente baixo. A metodologia baseia-se em reações enzimáticas rápidas na presença de substratos, inibidores e indutores específicos para cada enzima. As reações são dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e os substratos e metabólitos podem ser identificados/quantificados por técnicas cromatográficas, como CLAE ou CLUE com detecção por UV ou EM (NOMEIR et al., 2001; TSUJIMOTO et al., 2016).

Recentemente, vários trabalhos vêm utilizando enzimas recombinantes para estudos farmacocinéticos, tanto com fármacos como com produtos naturais ou alimentares, e também em estudos de interações (BASINSKA-ZIOBRON; DANIEL; WOJCIKOWSKI, 2015; LIU; SANTILLO, 2016; MOOIMAN et al., 2014). Pelos motivos citados, o estudo de interações entre as plantas medicinais escolhidas e o fármaco metoprolol, substrato marcador da enzima CYP2D6, foi efetuado utilizando a enzima CYP2D6 recombinante.

A enzima CYP2D6 foi selecionada como alvo para estudos das interações por ser uma enzima de grande relevância farmacocinética, como amplamente discutido no Capítulo I. Além dessa enzima, foram efetuados testes com a enzima recombinante CYP3A4 e seu substrato midazolam, entretanto não foi detectada a produção dos metabólitos característicos deste fármaco. Alterações exaustivas nas condições de reação, no método analítico e nos substratos utilizados foram testadas, porém não se obteve sucesso. Desta forma, esses resultados não serão discutidos nesta Tese. Contudo, pretende-se complementar os dados do artigo a seguir apresentado com futuras análises, utilizando a enzima CYP3A4 recombinante obtida de outro fornecedor, anteriormente à submissão do mesmo.

EFFECTS OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS ON CYP2D6 ENZYME-MEDIATED METABOLISM OF METOPROLOL

Feltrin, C.; Sandjo L. P.; Brambila, P.F.; Kratz, J.M.; Simões, C.M.O.#
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil
#Corresponding author: Cláudia Maria Oliveira Simões,
claudia.simoes@ufsc.br, Phone: +55-48-3721-5207

ABSTRACT

The indiscriminate use of medicinal plants concomitantly with conventional drugs may result in herb-drug interactions that cause fluctuations in drug bioavailability, and consequent therapeutic failure and/or toxic effects. The cytochrome P450 superfamily of enzymes plays an important role in herb-drug interactions, and the CYP2D6 enzyme is one of the most significant, since it metabolizes 30% of the drugs on the market. The aim of the present study was to investigate the occurrence of *in vitro* interactions of medicinal plant extracts in metoprolol metabolism mediated by the CYP2D6 enzyme. Standardized extracts of ten medicinal plants (*Cynara scolymus*; *Matricaria recutita*; *Camellia sinensis*; *Cecropia glaziovii*; *Echinacea* sp.; *Cimicifuga racemosa*; *Ilex paraguariensis*; *Ginkgo biloba*; *Bauhinia forficata* and *Glycine max*) were evaluated for their potential to modify metoprolol metabolism using a CYP2D6 recombinant enzyme. Among the tested extracts, *Camellia sinensis* (green tea) and *Cecropia glaziovii* (red embauba) inhibited *in vitro* activity of CYP2D6, presenting similar inhibition profiles to that observed for quinidine, which was used as positive control. Both extracts showed a concentration-dependent inhibition, with IC₅₀ values of 384.3 and 396.0 µg/mL for *Camellia sinensis* and *Cecropia glaziovii*, respectively. The major phytoconstituents of these extracts were identified by UHPLC-ESI-MS/MS. To our knowledge, this is the first time the *in vitro* CYP2D6 inhibition detected for *Cecropia glaziovii* is reported for this plant. In conclusion, *Camellia sinensis* and *Cecropia glaziovii* extracts inhibited CYP2D6 enzyme-mediated *in vitro* metabolism of metoprolol, an effect that could lead to clinically relevant interactions with substrates for this isoenzyme.

KEYWORDS: Herb-drug interactions; CYP2D6; metoprolol metabolism; UHPLC-ESI-MS

ABBREVIATIONS: [S]: Substrate concentration; CAM: Complementary and alternative medicine; CG: *Cecropia glaziovii*; CSi: *Camellia sinensis*; CYP: Cytochrome P450 enzymes; EMA: European Medicines Agency; FDA: Food and Drug Administration; IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration; K_m: Michaelis constant; NHIS: National Health Interview Survey; p: p value; RT: Retention time; TFA: Trifluoroacetic acid; V = Velocity; V_{max}: Maximal Velocity.

INTRODUCTION

Complementary and alternative medicine (CAM) is an age-old medicinal practice worldwide, in which medicinal plants play an important role (EKOR, 2014). According to the National Health Interview Survey (NHIS), the use of natural products is the most common complementary health approach among adults (NIH, 2016). Another NHIS study with more than 20,000 North American adults reported that around 38% of them used various types of CAM (NIH, 2008). However, this percentage is higher among patients with chronic and severe diseases (ENGDAL et al., 2008). Individuals suffering from chronic pain (NIH, 2016) or other specific diseases, such as cancer (ARSLAN et al., 2013), cardiovascular diseases (COHEN; ERNST, 2010), obesity, diabetes (SUN; WU; CHAU, 2016), neurocognitive disorders and HIV+/AIDS (KURAPATI et al., 2015), use natural products to complement conventional therapies, or for relief of symptoms (ENGDAL et al., 2008). Unfortunately, the assumption that these folk remedies are always safe serves to encourage their consumption without professional guidance (BRANTLEY et al., 2014). However, indiscriminate concomitant use of medicinal plants and drugs can place users at risk of herb-drug interactions (WILLIAMSON; DRIVER; BAXTER, 2009).

Herb-drug interactions are complex process that can occur with multiple medications targeting different metabolic pathways, and involving different compounds present in herbal products (BRANTLEY et al., 2014; VIJAYAKUMAR et al., 2015). These processes are not yet completely understood, but extensive research into herb-drug interactions has been conducted in the last years to provide more information about the way these interactions occur, and their impact on pharmacological treatments and patients' health (BRANTLEY et al., 2014; FENG et al., 2016; VIJAYAKUMAR et al., 2015).

These interactions usually occur when medicines and products prepared with medicinal plants are administered orally, since this is the most convenient route, and the one preferred by patients. However, this route exposes the xenobiotics to first-pass metabolism (HONÓRIO et al., 2013), a process involving several enzymes, including the cytochrome P450 (CYP) superfamily of enzymes. This superfamily is responsible for their biotransformation, controlling the plasma and tissue levels of the

compounds, and playing an important role in drug-drug and herb-drug interactions (HERMANN; VON RICHTER, 2012; WILLIAMSON et al., 2009).

Regulatory agencies, such as the Food and Drug Administration (FDA) of the USA and the European Medicines Agency (EMA), provide guidelines about interactions involving CYP enzymes and efflux transporters, and emphasize the need for further studies (EMA, 2012; FDA, 2012). Inhibition or induction of CYP enzymes may modify the bioavailability or other pharmacokinetic parameters of the drug, which can lead to therapeutic failure and/or toxic effects (ATHUKURI; NEERATI, 2016; YE et al., 2016).

CYP450 enzymes metabolize 70-80% of conventional drugs in clinical use, and the occurrence of drug-drug interactions and their implications are well documented (BAXTER, 2010; YU et al., 2014). Some herb-drug interactions (HERMANN; VON RICHTER, 2012; WILLIAMSON et al., 2009) are also documented, though to a lesser extent. Among the CYP enzymes, the second major drug metabolizing enzyme is CYP2D6, which catalyzes the metabolism of approximately 30% of the drugs available on the market (YE et al., 2016). Inhibition of this isoenzyme may lead to potential adverse drug interactions, through increased plasma levels of substrate and as a consequence, drug-induced toxicity (YU et al., 2014). For example, this enzyme catalyzes various classes of drugs, such as antidepressants, neuroleptics, beta-blockers and antiarrhythmics (INGELMAN-SUNDBERG, 2005), and several CYP2D6 inhibitor drugs, such as quinidine, paroxetine, fluoxetine, bupropion and cimetidine, are well known. There are recent reports of significant inhibition of CYP2D6 by drug metabolites (BORKAR et al., 2016) and natural products, for instance, goldenseal (*Hydrastis canadensis*), liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) and valerian (*Valeriana officinalis*) (SEVIOR et al., 2010). Secondary metabolites, such as polyphenols (ATHUKURI; NEERATI, 2016) and alkaloids (YE et al., 2014), were also described as inhibitors of CYP2D6.

In this study, standardized extracts of ten medicinal plants (*Cynara scolymus*; *Matricaria recutita*; *Camellia sinensis*; *Cecropia glaziovii*; *Echinacea* sp.; *Cimicifuga racemosa*; *Ilex paraguariensis*; *Ginkgo biloba*; *Bauhinia forficata* and *Glycine max*) were selected, and the occurrence of *in vitro* interactions of these extracts in metoprolol metabolism mediated by the human recombinant

CYP2D6 enzyme was investigated. Metoprolol is a selective β 1-receptor blocker and is usually used as a substrate in CYP2D6 metabolism studies. This drug is metabolized by CYP2D6 to form α -OH-metoprolol and O-demethylmetoprolol (BORKAR et al., 2016; YE et al., 2016), and it is well known that the production of O-demethylmetoprolol in human liver microsomal reactions occurs preferentially (MURTHY et al., 1990).

Extracts inhibiting CYP2D6 mediated-metabolism were also characterized by UHPLC-ESI-MS/MS to detect their major phytoconstituents and to explore their involvement in the CYP2D6 inhibition detected.

RESULTS AND DISCUSSION

Drug probe and metabolite characterization

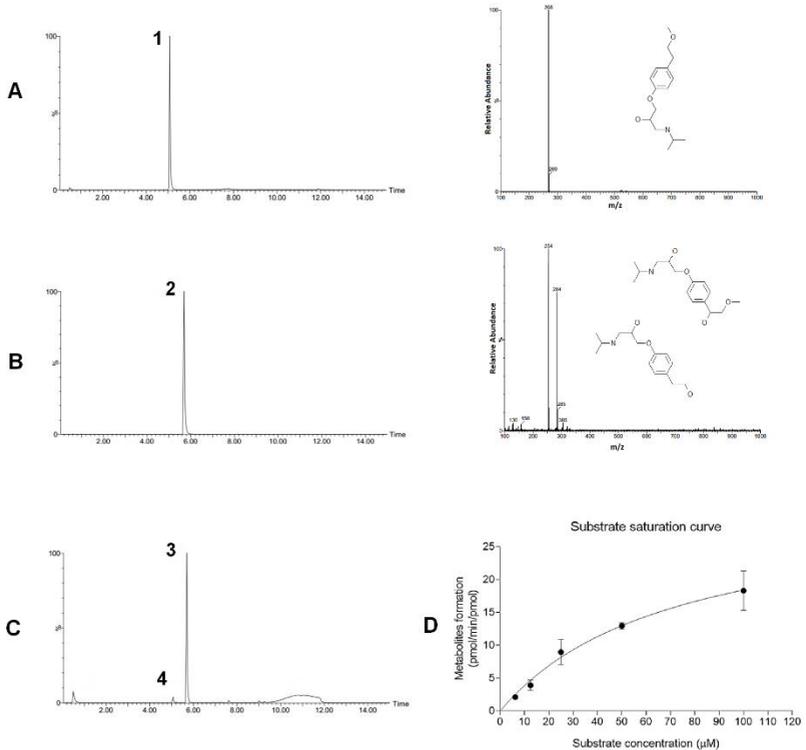
The changes in CYP2D6 metabolism by the selected standardized medicinal plant extracts were evaluated using metoprolol and the production of both metabolites was observed in this work. The LC-MS results of metoprolol and its metabolites is shown in Figure 1.

OH-metoprolol and O-demethylmetoprolol co-eluted, and no further separation was observed after several attempts. Since these molecules present similar polarity features, and both result from CYP2D6 metabolism, this peak was used for the quantification. The mass and retention times determined for metoprolol and its metabolites, as well their molecular formulas and the limits of quantification, are shown in Table 1. LC-MS data showed metoprolol at m/z 268.1926, OH-metoprolol at m/z 284.1832, and O-demethylmetoprolol at m/z 254.1729). These results corroborate those reported by Bokar and co-workers (2016) (BORKAR et al., 2016).

OH-metoprolol and O-demethylmetoprolol co-eluted, and no further separation was observed after several attempts. Since these molecules present similar polarity features, and both result from CYP2D6 metabolism, this peak was used for the quantification. The mass and retention times determined for metoprolol and its metabolites, as well their molecular formulas and the limits of quantification, are shown in Table 1. LC-MS data showed metoprolol at m/z 268.1926, OH-metoprolol at m/z 284.1832, and O-demethylmetoprolol at m/z 254.1729). These

results corroborate those reported by Bokar and co-workers (2016) (BORKAR et al., 2016).

Figure 1 - Probe drug and metabolites detected by UHPLC-MS and substrate saturation curve data.



A. Chromatogram of metoprolol peak extracted (peak 1) and mass spectra (m/z 268.1926). **B.** OH-metoprolol/O-demethylmetoprolol peak extracted (peak 2) and mass spectra (m/z 284.1832/ 254.1729). **C.** Metoprolol 80 μ M (peak 3) and metabolites (OH-metoprolol/O-demethylmetoprolol) (peak 4) chromatogram. **D.** Substrate saturation curve - metabolites formation rates (pmol/min/pmol of CYP2D6) in relation to metoprolol substrate concentrations (μ M) ($R^2 = 0.9429$). Curve was automatically fitted using nonlinear regression and the Michaelis–Menten equation; values are presented as mean \pm SEM.

Table 1 - Drug probe (metoprolol) and metabolites chemical characteristics.

Enzyme	CYP2D6
Probe substrate	Metoprolol
Mass detected	268.1926 g/mol
Retention time	5.70 min
Molecular formula	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃
Metabolites	OH-metoprolol / O-demethylmetoprolol
Mass detected	284.1832/ 254.1729 g/mol
Retention time	5.08 min
Molecular formula	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄ /C ₁₄ H ₂₃ NO ₃
Quantification limit (QL)	0.133 ± 0.046 µM
Kinetics characteristics	
K _m ^a	71.88 ± 19.46 µM
V _{max} ^a	31.64 ± 4.629 pmol/min/pmol of CYP2D6

^aData presented as mean ± SEM and determined by the Michaelis-Menten equation and nonlinear regression with confidence interval 95%.

To evaluate the probe drug concentration of CYP2D6 enzyme saturation and select the metoprolol concentration for the interaction studies with the extracts, a substrate saturation curve was obtained using serial dilutions of metoprolol (Fig. 1D). The kinetic characteristics of metoprolol metabolism *in vitro* (K_m and V_{max}) are shown in Table 1, and were estimated by nonlinear regression (R² = 0.9429) and by the Michaelis-Menten equation. The V_{max} obtained was 31.64 ± 4.63 pmol/min/pmol of CYP2D6. The K_m value determined (71.88 ± 19.46 µM) was close to those obtained in another study, also using CYP2D6 (54 ± 9 to 81 ± 24 µM) (CRESPI et al., 1995).

Based on the substrate saturation curve of metoprolol, the concentration of 80 µM was chosen for the subsequent herb-drug interaction *in vitro* assays. This concentration is below the amount necessary for enzymatic saturation, which is close to the value of K_m, and enabled drug probe and metabolites detection by UHPLC-MS.

Alteration of CYP2D6 enzymatic activity by medicinal plant extracts

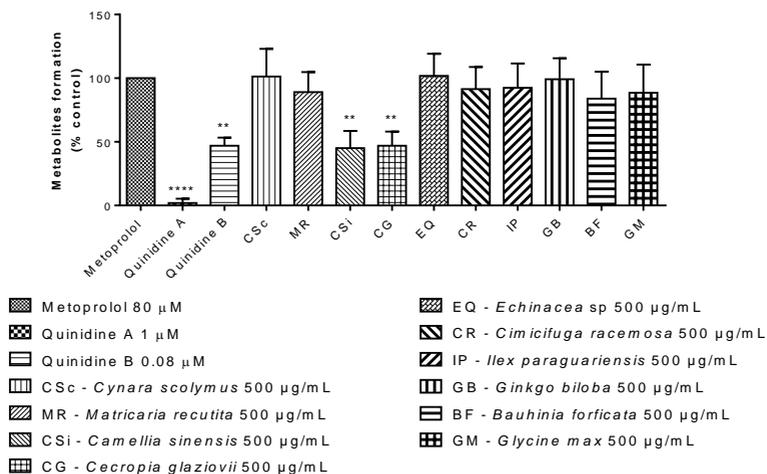
Potential modifications in CYP2D6 enzymatic activity were evaluated using the standardized extracts at 500 µg/mL. This concentration was selected to maintain the highest extract amount soluble in aqueous medium. Quinidine was used as positive control, since it is a CYP2D6 selective inhibitor drug recommended by the FDA for *in vitro* metabolism studies (FDA, 2012). Two concentrations of quinidine were used (1.00 and 0.08 µM) to induce inhibition of approximately 100% and 50% of enzymatic activity, respectively.

In vitro herb-drug interaction data are shown in Figure 2. Statistically, a significant reduction ($p < 0.01$) of metoprolol metabolites production was observed in the presence of *Camellia sinensis* (CSi) and *Cecropia glaziovii* (CG) extracts, when compared to the blank control (metoprolol), being similar to the inhibition caused by quinidine (0.08 µM). The treatment with quinidine at 1.00 µM showed a statistically significant 100% inhibition ($p < 0.0001$) of metoprolol metabolites formation. All other tested extracts did not abolish the metoprolol metabolism by the CYP2D6 enzyme.

Green tea (*Camellia sinensis*) is the herbal remedy most frequently used concurrently with chemotherapy (ENGDAL et al., 2008). It is also used to treat hypercholesterolemia (COHEN; ERNST, 2010) among other diseases due to the presence of theanine, phenolic compounds and methylxanthine (FANG et al., 2017) to which the therapeutic activities are attributed.

CYP2D6 inhibition studies *in vitro* and *in vivo* present quite conflicting results. *In vitro* inhibition of CYP2D6 by CSi extract observed in this study is in agreement with the previous results obtained by Misaka and co-workers (2013), who reported inhibition of dextromethorphan demethylation, another drug probe used as CYP2D6 substrate (MISAKA et al., 2013). However, an *in vivo* study with repeated administration of green tea decaffeinated extract has not shown a significant alteration on CYP2D6 drug biotransformation (DONOVAN et al., 2004).

Figure 2 - Potential alterations on CYP2D6 enzymatic activity in the presence of medicinal plant standardized extracts (500 µg/mL).



Data are expressed as percentages (%) and normalized to metoprolol. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the post-hoc Dunnett's test (confidence interval 95%). ** ($p < 0.01$); **** ($p < 0.0001$). Data were obtained from three independent experiments (mean \pm SEM).

Non-compliant results may occur by chemical or *in vivo* metabolic changes that modify CYP2D6 inhibition, or as the result of variations in chemical composition of the medicinal plant extracts. As demonstrated by Fang and co-workers (2017), the concentration of marker compounds of *Camellia sinensis* may vary according to the cultivar, the drying method, and the time of harvest [33], which may help explain the conflicting results reported in the literature for CYP2D6 inhibition. However, studies correlating *in vivo* and *in vitro* data are necessary to adequately elucidate the differences observed.

Red embauba (*Cecropia glaziovii*) has important biological effects (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011) such as anti-inflammatory, antioxidant (MULLER et al., 2016), hepatoprotective (PETRONILHO et al., 2012), antiviral (PETRONILHO et al., 2012; SILVA et al., 2010), anti-acid secretion (SOUCCAR et al., 2008), and antihypertensive activities (LIMA-LANDMAN et al., 2007), which may be attributed to the presence of catechins,

procyanidins, flavonoids, and chlorogenic and caffeic acids (AREND et al., 2011). As shown in Figure 2, CG extract inhibited CYP2D6 activity in similar form to the CSi extract and the positive control quinidine 0.08 μM (> 50%) at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. To the best of our knowledge, this is the first study to describe *in vitro* CYP2D6 inhibition for this plant.

All other tested extracts did not result in changes in CYP2D6 metabolism. In a study performed with *Matricaria recutita* essential oil and its isolated compounds, Ganzera and co-workers (2006) observed that CYP2D6 was less significantly affected by the isolated compounds than by the crude oil. However, in the same study, a few isolated compounds inhibited other CYP enzymes, such as CYP1A2 and CYP3A4 (GANZERA; SCHNEIDER; STUPPNER, 2006).

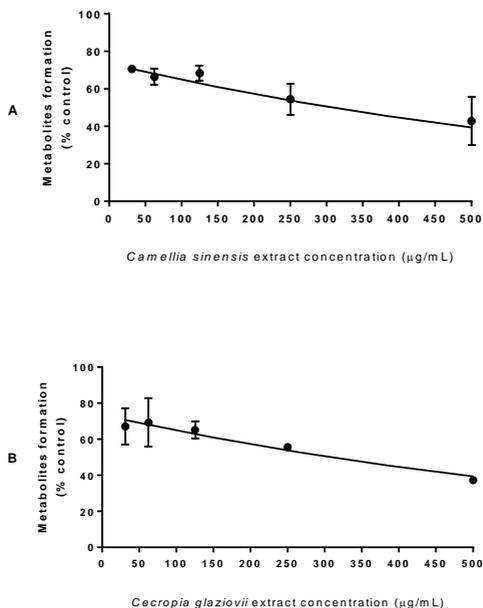
Gurley and co-workers (2008) did not detect significant effects *in vivo* on CYP2D6 activity caused by *Echinacea purpurea* and *Cimicifuga racemosa* (TANAE et al., 2007); the same finding was observed for *Cimicifuga racemosa* by Sevier and co-workers (2010) (GURLEY et al., 2008; SEVIOR et al., 2010). Furthermore, *in vivo* assays performed with soy (*Glycine max*) extract containing isoflavones did not affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metoprolol, as shown by Su and co-workers (2012) (SU et al., 2012).

In summary, all these results confirmed our findings. Little or no information concerning CYP2D6 inhibition by the other tested extracts is available in the literature. Indeed, as far as we know, the extracts of *Cynara scolymus*; *Ilex paraguariensis* and *Bauhinia forficata* were evaluated here for the first time in relation to the potential inhibitory effects of *in vitro* CYP2D6 activity.

CSi and CG extracts inhibition curves

CYP2D6 inhibition curves were determined for the extracts, which demonstrated statistically significant inhibition of metoprolol metabolism ($p = 0.01$) (Fig. 2), and their IC_{50} values were calculated. As shown in Figure 3, CSi and CG extracts showed similar inhibition, profiles with very similar IC_{50} values (CSi: 384.3 and CG: 396.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; R^2 : 0.97). For both, a concentration-dependent inhibition was verified.

Figure 3 - *Camellia sinensis* (A) and *Cecropia glaziovii* (B) inhibition curves.



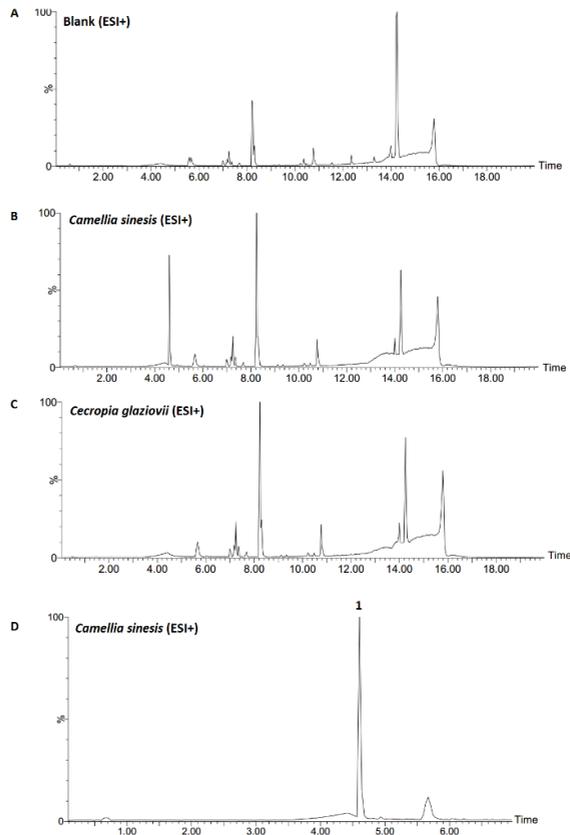
Data were analyzed by non-linear regression and represent each extract concentrations ($\mu\text{g/mL}$) versus % of metoprolol metabolites formation normalized to the control. Data were obtained from three independent experiments.

Identification of major phytoconstituents of *Camellia sinensis* and *Cecropia glaziovii* by UHPLC-ESI-MS/MS

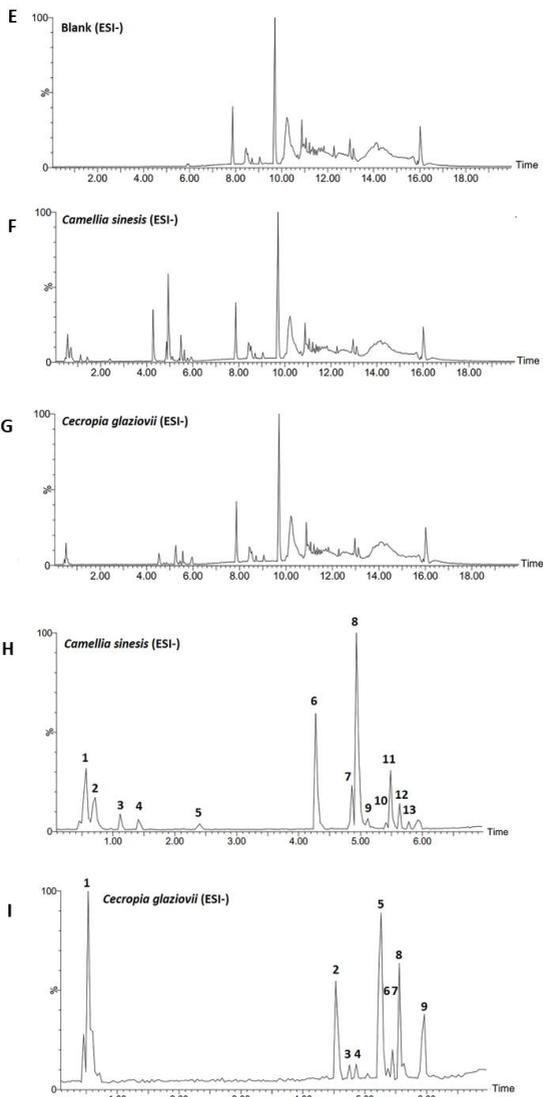
To study the possible phytoconstituents that could be responsible for the detected *in vitro* inhibition of CYP2D6, the major compounds of CSi and CG were identified by UHPLC-ESI-QToF-MS/MS. Figure 4 shows the chromatograms of the eluent blank (A and E) and both extracts in ESI + (B, C, and D) and ESI - (F, G, H, and I) modes. For CSi and CG, 13 and 9 peaks were detected, respectively, corresponding to the major constituents of the extracts. The characterization of these compounds is shown in Tables 2 and 3, as well as their retention times, m/z peaks, molecular formulas, fragments, and common names.

The major metabolites found in CSi extract are caffeine, catechin, epigallocatechin gallate and epigallocatechin, which are well known chemomarkers present in different cultivars of *Camellia sinensis* (FANG et al., 2017). For the CG extract, the major phytoconstituents identified in this work [catechin, epicatechin, caffeoylquinic acid, procyanidins, C-glycosylflavonoids (vitexin, Isoorientin and isovitexin)] also corroborate those described in the literature (COSTA et al., 2011; TANAE et al., 2007).

Figure 4 - Chromatograms of *Camellia sinensis* (CSi) and *Cecropia glaziovii* (CG) obtained by UHPLC-MS/MS for their major compounds identification.



Capítulo IV – Enzima recombinante CYP2D6 218



Eluent blank chromatograms (**A** and **E**); CSi chromatograms in ESI + (**B**) and ESI - (**F**); CG chromatograms in ESI + (**C**) and ESI - (**G**); Expanded chromatograms of CSi ESI + (**D**), CSi ESI - (**H**) and CG ESI - (**I**) indicating the peaks analyzed by UHPLC-MS/MS.

Table 2 - Characterization of the major phytoconstituents of CSi (*Camellia sinensis*) standardized extract.

Peak	RT (min)	(Expt. m/z)	Molecular formulas	Fragments	Common names
ESI (+)					
1	4.60	195.0876	$[C_8H_{12}N_4O_2+H]^+$	-	Caffeine
ESI (-)					
1	0.57	191.0562	$[C_7H_{12}O_6-H]^-$	-	Quinic acid
2	0.71	191.0194	$[C_7H_8O_7-H]^-$	-	Citric acid
3	1.12	169.0155	$[C_7H_6O_5-H]^-$	-	Gallic acid
4	1.41	343.0701	$[C_{14}H_{16}O_{10}-H]^-$	125.0238, 127.0416, 173.0478, 191.0562	3-O-galloylquinic acid or 4-O-galloylquinic acid or 5-O-galloylquinic acid
5	2.40	305.0652	$[C_{15}H_{14}O_7-H]^-$	125.0261, 137.0267, 149.0542, 167.0331, 179.0374, 204.0441, 219.0621	Gallocatechin
6	4.27	305.0652	$[C_{15}H_{14}O_7-H]^-$	125.0238, 137.0267, 149.0542, 167.0331, 179.0374, 204.0441, 219.0621	Epigallocatechin
7	4.86	289.0742	$[C_{15}H_{14}O_6-H]^-$	109.0289, 112.0496 123.0447, 125.0238, 137.0243, 151.0430, 188.0458, 203.0665	Catechin
8	4.93	457.0813	$[C_{22}H_{18}O_{11}-H]^-$	125.0238, 161.0234, 169.0129, 170.0178	Gallocatechin 3-gallate or Epigallocatechin-3-gallate

Capítulo IV – Enzima recombinante CYP2D6 220

9	5.12	457.0813	[C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁ -H] ⁻	125.0238, 161.0234, 169.0129, 170.0178	Gallocatechin 3-gallate or Epigallocatechin-3-gallate
10	5.41	771.1968	[C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁ -H] ⁻	301.0678	Quercetin 3-O-β-D- glucopyranosyl (1->3)-a- L-rhamnopyranosyl (1- >6)-β-D- galactopyranoside or Quercetin 3-O-β-D- glucopyranosyl (1->3)-a- L-rhamnopyranosyl (1- >6)-β-D-glucopyranoside
11	5.48	441.0851	[C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀ -H] ⁻	125.0238, 169.0155 245.0826, 289.0742	Epicatechin gallate
12	5.63	755.2072	[C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀ -H] ⁻	-	Camelliaside A or Kaempferol-3-O-[β-D- glucopyranosyl-(1->3)-O- α-L-rhamnopyranosyl-(1- >6)-O-β-D- galactopyranoside]
13	5.78	739.2014	[C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉ -H] ⁻	151.0027, 285.0400, 593.1564	Kaempferol 3-O-[α-L- rhamnopyranosyl-(1->3)- α-L-rhamnopyranosyl-(1- >6)]-β-D-glucopyranoside

Table 3 - Characterization of the major phytoconstituents of CG (*Cecropia glaziovii*) standardized extract.

Peak	RT (min)	(Expt. m/z)	Molecular formulas	Fragments	Common names
ESI (-)					
1	0.53	195.0530	[C ₁₆ H ₁₈ O ₉ -H] ⁻	-	-
2	4.53	353.0890	[C ₁₆ H ₁₈ O ₉ -H] ⁻	191.0592	Caffeoylquinic acid
3	4.75	577.1353	[C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ -H] ⁻	125.0261, 151.0405, 245.0858, 289.0742, 407.0716	Procyanidin B2, B3, B4, B5, or B7
4	4.86	289.0742	[C ₁₅ H ₁₄ O ₆ -H] ⁻	109.0289, 123.0424, 125.0261, 137.0147, 151.0379, 188.0458 203.0714	Catechin or Epicatechin
5	5.26	447.0953	[C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ -H] ⁻	327.0648, 357.0666	Isorientin or Luteolin-8-C-glucoside
6	5.37	593.1514	[C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ -H] ⁻	119.0354, 243.0324, 269.0422, 293.0456 353.0698, 413.0833 473.1130	Vicenin-2
7	5.45	563.1394	[C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄ -H] ⁻	293.0491, 311.0591, 323.0561, 341.0707, 353.0621, 413.0916 443.1084	Schaftoside or vicenin-1

Capítulo IV – Enzima recombinante CYP2D6 222

8	5.56	431.1021	[C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ -H] ⁻	161.0260, 282.0510, 283.0594, 311.0591, 341.0669, 342.0569	Isovitexin or vitexin
9	5.96	473.1130	[C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ -H] ⁻	281.0479, 283.0628, 311.0555, 323.0561, 341.0659, 354.0707, 413.0916, 431.1021	Acetylvitexin

As showed in Tables 2 and 3, both extracts that inhibited CYP2D6 enzymatic activity contain catechin and its derivatives. Considering the similar CYP2D6 inhibition profiles presented by these extracts (Fig. 3), it seems that catechins may be the inhibitory reaction agents. Su and co-workers (2012) investigated *in silico* the inhibitory potential of 43 flavonoids and related-flavonoids, such as kaempferol, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, gallic acid, and four plant extracts rich in flavonoids (soy, grape seed, ginkgo and milk thistle), which showed low values of K_i ($< 6.88 \mu\text{M}$) suggesting strong CYP2D6 inhibition by these samples (SU et al., 2012). However, Satoh and co-workers (2016) investigated potential inhibition of CYP enzymes by eight catechins derived from green tea using human liver microsomes, but did not find any CYP2D6 inhibition ($\text{IC}_{50} > 97,2 \mu\text{M}$). On the other hand, these authors showed significant inhibition of other CYP enzymes, such as CYP1A1, CYP2C9 and CYP3A4, by catechin-3-O-gallate, gallic acid-3-O-gallate and epigallocatechin-3-O-gallate (SATO et al., 2016). Moreover, Misaka and co-workers (2013) tested CYP enzyme inhibition by an extract of green tea (86.5% total catechins) and epigallocatechin-3-O-gallate, and showed that the most affected enzymes were CYP2B6, CYP2C8 and CYP3A, and to a lesser extent, CYP2D6. Taken together, these contradictory results suggest that the detected inhibition of CYP2D6 activity may be associated with the presence of other components, rather than the catechins alone.

In relation to CSi extract, other possible CYP2D6 inhibitory agents could be gallic acid and/or quercetin. Gallic acid is one of the main phenolic compounds present in green tea (ATHUKURI; NEERATI, 2016) and its CYP2D6 inhibitory activity was already demonstrated *in vitro* (VIJAYAKUMAR et al., 2015) and *in vivo* (ATHUKURI; NEERATI, 2016). Savai and co-workers (2015), using human liver microsomes, demonstrated potent CYP2D6 inhibitory activity for quercetin and less potent inhibitory activity for kaempferol (SAVAI et al., 2015). Thus, it seems that these compounds could be responsible, at least in part, for the inhibitory effect detected for CSi.

The phytochemical, pharmacological and pharmacokinetic properties of *Cecropia glaziovii* are less studied than those of *Camellia sinensis*. However, some phytoconstituents present in *Cecropia glaziovii* were also studied in relation to CYP enzyme interactions. According to Narayanaswamy and co-workers (2016),

using *in silico* analyses, orientin and isorientin did not present CYP2D6 inhibition, although isovitexin and vitexin showed CYP2D6 inhibition effects (NARAYANASWAMY et al., 2016). Additionally, as demonstrated by Ahmmed and co-workers (2015), chlorogenic acid (= caffeoylquinic acid) also inhibited CYP2D6 activity *in vitro* (AHMMED et al., 2015). Thus, isovitexin, vitexin and/or chlorogenic acid could be responsible for the CYP2D6 inhibitory effects observed for CG in this study. Nonetheless, further studies using these isolated compounds are required to determine the CYP2D6 inhibition profile.

It was shown in this work that two standardized extracts, CSi and CG, inhibited metoprolol metabolism mediated by CYP2D6 with similar profiles to that observed for quinidine, a stronger CYP2D6 inhibitor. Although inhibition of CYP2D6 by *Camellia sinensis* has already been reported, *in vitro* CYP2D6 inhibition by *Cecropia glaziovii* extract is described in this work for the first time.

In conclusion, this study suggests that the use of products or preparations derived from *Camellia sinensis* or *Cecropia glaziovii* concomitantly with drugs metabolized by CYP2D6 may lead to herb-drug interactions. Furthermore, many other natural preparations containing the same phytoconstituents present in those extracts may affect drug bioavailability and result in herb-drug interactions. Further mechanistic and *in vivo* experiments are required to fully assess their safety profile.

MATERIALS AND METHODS

Materials

CYP2D6 enzyme and chemicals

Cytochrome P450 2D6 human enzyme (E9413), Trizma® base, NaCl, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), trifluoroacetic acid (TFA), and quinidine were purchased from Sigma-Aldrich. Metoprolol tartrate (*HenriFarma Produtos Químicos e Farmacêuticos*) was generously provided by the Pharmaceutical Biology Laboratory from the Department of Pharmaceutical Sciences (*Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC*). All HPLC grade solvents were obtained from Merck. Information on the tested extracts is shown in Table 4.

Table 4 - Tested standardized extracts.

Medicinal plant ^c	Family	Code	Common name	Supplier
<i>Cynara scolymus</i> L.	Asteraceae	CSc	Globe artichoke	Vita Essência Pharmacy
<i>Matricaria recutita</i> L.	Asteraceae	MR	Chamomile	VitalFarm Pharmacy
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.	Theaceae	CSi	Green tea	Vita Essência Pharmacy
<i>Cecropia glaziovii</i> Sneth.	Urticaceae	CG	Red embaúba	Laboratory of Pharmacognosy
<i>Echinacea</i> sp.	Asteraceae	EQ	Coneflower	Vita Essência Pharmacy
<i>Cimicifuga racemosa</i> L.	Ranunculaceae	CR	Black cohosh	Vita Essência Pharmacy
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.	Aquifoliaceae	IP	Mate	Laboratory of Pharmacognosy
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgoaceae	GB	Ginkgo	Vita Essência Pharmacy
<i>Bauhinia forficata</i> Link.	Fabaceae	BF	Orchid tree	Laboratory of Pharmacognosy
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Fabaceae	GM	Soy	Vita Essência Pharmacy

^c These materials are referred as standardized extracts and are conformed to the analytical requirements.

Methods

Drugs and extracts preparation

Stock solutions of metoprolol (1 mM), quinidine (0.5 and 100 μ M), and standardized extracts (1,000 μ g/mL) were solubilized in a mixture of 50 mM Tris (pH 7.4) and 1 mM EDTA. The solutions were filtered through 0.22 μ m membranes and used directly for the enzyme reactions. For the dereplication studies of the extracts, they were solubilized in ultrapure water (100 and 200 μ g/mL). To prepare the inhibition curves, the extracts were diluted 1:2 v/v in a mixture containing 50 mM Tris (pH 7.4) and 1 mM EDTA.

Enzyme reaction conditions

The assays were performed according to the Sigma protocols, with minor modifications. Briefly, the mixture reactions containing metoprolol, with or without quinidine or the extracts, Tris (pH 7.4) 50 mM and 1 mM EDTA were pre-incubated at 30°C for 5 min; 1 pmol of Cytochrome P450 2D6 human enzyme and 600 μ M NADPH were added to initiate the reactions. Reaction mixtures (50 μ L) were incubated at 30°C for 10 min and the reactions were stopped by adding 1 μ L of trifluoroacetic acid 50%. The samples were placed in an ice bath for 1 min. Next, cold acetonitrile (ACN) (49 μ L) was added to the mixtures, vortexed for 30 s and centrifuged for 10 min at 9,400 x *g*. The supernatants were collected for ultra-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS) analyses. The mixture reactions without the enzyme and without quinidine were used as negative and reaction controls, respectively, and the mixture reaction with quinidine was used as positive control. Three independent experiments were used for all the analyses.

Inhibition curves of the extracts

The inhibition curves were determined for two extracts (CSi and CG), for which statistically significant inhibition ($p < 0.01$) of metoprolol metabolism was detected. The extracts were diluted and tested from 500 to 31.25 μ g/mL, and the CYP2D6 inhibition assays were performed according to the enzyme reaction conditions described above.

Instrumentation of ESI-QTOF/MS analyses

The separations were performed on an Acquity UHPLC system class H (Waters) equipped with a photodiode array (PDA) detector, an autosampler manager and a quaternary pump. The separation was achieved on a BEH C18 1.7 μm column 2.1 x 100 mm Acquity UPLC (Waters). The LC device is coupled to a Xevo G2-S QToF (Waters) used to record mass data through an electrospray probe operating in positive (ESI +) and negative (ESI -) ionization modes. Data were processed using the software MassLynx V4.1.

UHPLC and ESI-QTOF-MS conditions of metoprolol, its metabolites and standardized extracts

The volume of sample injected was 2 μL ; the autosampler temperature was set at 6°C; the column temperature was set at 40°C, and the mobile phase was a gradient of ACN and H₂O-formic acid 0.1% at a flow rate 0.4 mL/min as follow: ACN at 2% for 3 min, increased to 90% in 6 min, maintained to 90% for 1 min, and then returned to 2% for 5 min.

The mass spectrometric parameters were: positive mode (ESI +), collision gas: argon, nebulizer gas: nitrogen, capillary 2 kV, sampling cone 40 V, source temperature 90°C, desolvation temperature 300°C, cone gas flow 200 L/H, desolvation gas flow 900 L/H, scan time 1 s, start mass 100 and end mass 1000, and leucine enkephalin was used as a reference compound to determine the masses accurately.

The MS conditions were the same as those described for metoprolol and its metabolites, except that the standardized extracts were sensitive to the negative (ESI -) ion mode.

UHPLC and ESI-QTOF-MS/MS conditions of the standardized extracts

The LC conditions were a gradient of ACN and H₂O-formic acid 0.1% (ACN 2% for 2 min, increased to 95% in 12 min, maintained to 95% for 1 min 30 s, then returned to 2% for 30 s and lasted 5 min).

MS/MS analyses were recorded at collision energies of 28 eV (m/z 300 - 400) and 30 eV ($m/z > 400$) in ESI -, scan time 1 s and mass range 80 to 1,000.

Statistical analyses

All the data were analyzed using Microsoft Excel® 2016 and GraphPad Prism 5 and obtained from three independent experiments. For the substrate saturation curves, the data were expressed as mean \pm standard error mean (SEM). The values of K_m and V_{max} were determined by non-linear regression and the Michaelis-Menten equation $\{V = V_{max}[S]/(K_m+[S])\}$. Data on the potential changes in CYP2D6 enzymatic activity by the tested plant extracts were expressed as mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA followed by the post-hoc Dunnett's test (confidence interval 95%). The inhibition curve data for the extracts were expressed as mean \pm SEM and analyzed by non-linear regression.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the PIs of the Pharmacognosy and Pharmaceutical Biology Laboratories of the Department of Pharmaceutical Sciences (UFSC) for generously donating the standardized extracts (CG, IP, and BF) and metoprolol tartrate, respectively, and for enabling the analyses by UHPLC-MS/MS. We also thank CNPq (MCTI) for the financial support, and Vitor Clasen Chaves for his technical assistance. Professor Flávio Henrique Reginatto is also acknowledged for his important contributions to this manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. *Ekor M.* The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol* 2014; 4: 177

2. *NIH*. National Institutes of Health. 2016 Strategic Plan. In: United States: National Institutes of Health; 2016: 48
3. *NIH*. National Institutes of Health. According to a New Government Survey, 38 Percent of Adults and 12 Percent of Children Use Complementary and Alternative Medicine In. Maryland: National Institutes of Health. Available at <https://nccih.nih.gov/news/2008/121008.htm>. Accessed January 5, 2017.
4. *Engdal S, Steinsbekk A, Klepp O, Nilsen OG*. Herbal use among cancer patients during palliative or curative chemotherapy treatment in Norway. *Support Care Cancer* 2008; 16: 763-769
5. *Arslan D, Tural D, Akar E*. Herbal administration and interaction of cancer treatment. *J Palliat Med* 2013; 16: 1466-1476
6. *Cohen PA, Ernst E*. Safety of herbal supplements: a guide for cardiologists. *Cardiovasc Ther* 2010; 28: 246-253
7. *Sun NN, Wu TY, Chau CF*. Natural Dietary and Herbal Products in Anti-Obesity Treatment. *Molecules* 2016; 21: 1351
8. *Kurapati KR, Atluri VS, Samikkannu T, Garcia G, Nair MP*. Natural Products as Anti-HIV Agents and Role in HIV-Associated Neurocognitive Disorders (HAND): A Brief Overview. *Front Microbiol* 2015; 6: 1444
9. *Brantley SJ, Argikar AA, Lin YS, Nagar S, Paine MF*. Herb-drug interactions: challenges and opportunities for improved predictions. *Drug Metab. Dispos* 2014; 42: 301-317
10. *Williamson E, Driver S, Baxter K*. *Stockley's Herbal Medicines Interactions*. London: Pharmaceutical Press; 2009: 432
11. *Vijayakumar TM, Kumar RM, Agrawal A, Dubey GP, Ilango K*. Comparative inhibitory potential of selected dietary bioactive polyphenols, phytosterols on CYP3A4 and CYP2D6 with fluorometric high-throughput screening. *J Food Sci Technol* 2015; 52: 4537-4543

12. Feng R, Tan XS, Wen BY, Shou JW, Fu J, He CY, Zhao ZX, Li XY, Zhu HX, Zhu P, Shi JG, Che CT, Yeung JH, Zhang XF, Wang Y. Interaction effects on cytochrome P450 both *in vitro* and *in vivo* studies by two major bioactive xanthenes from *Halenia elliptica* D. Don. Biomed Chromatogr 2016; 30: 1953-1962

13. Honório KM, Moda TL, Andricopulo AD. Pharmacokinetic Properties and In Silico ADME Modeling in Drug Discovery. Medicinal Chemistry 2013; 9: 163-176

14. Hermann R, von Richter O. Clinical evidence of herbal drugs as perpetrators of pharmacokinetic drug interactions. Planta Med 2012; 78: 1458-1477

15. FDA. Guidance for Industry Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. In: United States: Food and Drug Administration; 2012: 79

16. EMA. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. In: London; 2012: 60

17. Athukuri BL, Neerati P. Enhanced oral bioavailability of metoprolol with gallic acid and ellagic acid in male Wistar rats: involvement of CYP2D6 inhibition. Drug Metab Pers Ther 2016; 31: 229-234

18. Ye LH, Kong LT, Yan MZ, Cao FR, Wang LS, Liao YH, Pan RL, Chang Q. Lotus leaf alkaloid fraction can strongly inhibit CYP2D6 isoenzyme activity. J Ethnopharmacol 2016; 194: 913-917

19. Yu J, Ritchie TK, Mulgaonkar A, Ragueneau-Majlessi I. Drug disposition and drug-drug interaction data in 2013 FDA new drug applications: a systematic review. Drug Metab Dispos 2014; 42: 1991-2001

20. Baxter K. Stockley's Drug Interactions. 9 ed. London: Pharmaceutical Press; 2010.

21. *Ingelman-Sundberg M*. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005; 5: 6-13
22. *Borkar RM, Bhandi MM, Dubey AP, Ganga Reddy V, Komirishetty P, Nandekar PP, Sangamwar AT, Kamal A, Banerjee SK, Srinivas R*. An evaluation of the CYP2D6 and CYP3A4 inhibition potential of metoprolol metabolites and their contribution to drug-drug and drug-herb interaction by LC-ESI/MS/MS. *Biomed Chromatogr* 2016; 30: 1556-1572
23. *Seviour DK, Hokkanen J, Tolonen A, Abass K, Tursas L, Pelkonen O, Ahokas JT*. Rapid screening of commercially available herbal products for the inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes using the N-in-one cocktail. *Xenobiotica* 2010; 40: 245-254
24. *Ye LH, He XX, Kong LT, Liao YH, Pan RL, Xiao BX, Liu XM, Chang Q*. Identification and characterization of potent CYP2D6 inhibitors in lotus leaves. *J Ethnopharmacol* 2014; 153: 190-196
25. *Murthy SS, Shetty HU, Nelson WL, Jackson PR, Lennard MS*. Enantioselective and diastereoselective aspects of the oxidative metabolism of metoprolol. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 1637-1644
26. *Crespi CL, Steimel DT, Penman BW, Korzekwa KR, Fernandez-Salguero P, Buters JT, Gelboin HV, Gonzalez FJ, Idle JR, Daly AK*. Comparison of substrate metabolism by wild type CYP2D6 protein and a variant containing methionine, not valine, at position 374. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 234-243
27. *Fang R, Redfern SP, Kirkup D, Porter EA, Kite GC, Terry LA, Berry MJ, Simmonds MS*. Variation of theanine, phenolic, and methylxanthine compounds in 21 cultivars of *Camellia sinensis* harvested in different seasons. *Food Chem* 2017; 220: 517-526
28. *Misaka S, Kawabe K, Onoue S, Werba JP, Girolli M, Tamaki S, Kan T, Kimura J, Watanabe H, Yamada S*. Effects of Green Tea Catechins on Cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A

Activities in Human Liver and Intestinal Microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2013; 28: 244-249

29. *Donovan JL, Chavin KD, Devane CL, Taylor RM, Wang JS, Ruan Y, Markowitz JS.* Green tea (*Camellia sinensis*) extract does not alter cytochrome p450 3A4 or 2D6 activity in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos* 2004; 32: 906-908

30. *Costa GM, Schenkel EP, Reginatto FH.* Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Nat Prod Commun* 2011; 6: 913-920

31. *Muller SD, Florentino D, Ortmann CF, Martins FA, Danielski LG, Michels M, de Souza Constantino L, Petronilho F, Reginatto FH.* Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* leaves. *J Ethnopharmacol* 2016; 185: 255-262

32. *Petronilho F, Dal-Pizzol F, Costa GM, Kappel VD, de Oliveira SQ, Fortunato J, Cittadini-Zanette V, Moreira JC, Simoes CM, Dal-Pizzol F, Reginatto FH.* Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia glaziovii* (embauba-vermelha) against acyclovir-resistant strain. *Pharm Biol* 2012; 50: 911-918

33. *Silva IT, Costa GM, Stoco PH, Schenkel EP, Reginatto FH, Simoes CM.* *In vitro* antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. *Lett Appl Microbiol* 2010; 51: 143-148

34. *Souccar C, Cysneiros RM, Tanae MM, Torres LM, Lima-Landman MT, Lapa AJ.* Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. *Phytomedicine* 2008; 15: 462-469

35. *Lima-Landman MT, Borges AC, Cysneiros RM, De Lima TC, Souccar C, Lapa AJ.* Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an *in vivo* approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine* 2007; 14: 314-320

36. Arend DP, dos Santos TC, Sonaglio D, Dos Santos AL, Reginato FH, de Campos AM. Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth. J Pharm Biomed Anal 2011; 54: 58-66
37. Ganzera M, Schneider P, Stuppner H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. Life Sci 2006; 78: 856-861
38. Gurley BJ, Swain A, Hubbard MA, Williams DK, Barone G, Hartsfield F, Tong Y, Carrier DJ, Cheboyina S, Battu SK. Clinical assessment of CYP2D6-mediated herb-drug interactions in humans: effects of milk thistle, black cohosh, goldenseal, kava kava, St. John's wort, and Echinacea. Mol Nutr Food Res 2008; 52: 755-763
39. Su Z, Zhang B, Zhu W, Du Z. *In silico* and *in vivo* evaluation of flavonoid extracts on CYP2D6-mediated herb-drug interaction. J Mol Model 2012; 18: 4657-4663
40. Tanae MM, Lima-Landman MT, De Lima TC, Souccar C, Lapa AJ. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. Phytomedicine 2007; 14: 309-313
41. Satoh T, Fujisawa H, Nakamura A, Takahashi N, Watanabe K. Inhibitory Effects of Eight Green Tea Catechins on Cytochrome P450 1A2, 2C9, 2D6, and 3A4 Activities. J Pharm Pharm Sci 2016; 19: 188-197
42. Savai J, Varghese A, Pandita N, Chintamaneni M. Investigation of CYP3A4 and CYP2D6 Interactions of *Withania somnifera* and *Centella asiatica* in Human Liver Microsomes. Phytother Res 2015; 29: 785-790
43. Narayanaswamy R, Isha A, Wai LK, Ismail IS. Molecular Docking Analysis of Selected *Clinacanthus nutans* Constituents as Xanthine Oxidase, Nitric Oxide Synthase, Human Neutrophil Elastase, Matrix Metalloproteinase 2, Matrix Metalloproteinase 9

and Squalene Synthase Inhibitors. *Pharmacognosy Magazine* 2016; 12: S21-26

44. *Ahmed SKM, Mukherjee PK, Bahadur S, Kar A, Al-Dahbi NA, Duraipandiyar V.* Inhibition potential of *Moringa oleifera* Lam. on drug metabolizing enzymes. *Indian J Tradit Know* 2015; 14: 614-619

3. DISCUSSÃO

A análise por CLUE-EM permitiu detectar os metabólitos do fármaco metoprolol (OH-metoprolol e O-demetilmetoprolol), utilizado como substrato das reações enzimáticas com a enzima recombinante CYP2D6. Os parâmetros K_m e V_{max} foram determinados e foram semelhantes ao relatado na literatura por Crespi e colaboradores (1995).

Com base nos valores de K_m , foi utilizada a concentração de 80 μM para os ensaios de inibição da CYP2D6 com os extratos das plantas medicinais em estudo e o fármaco inibidor quinidina. Dois dos extratos testados, *Camellia sinensis* (CSi) e *Cecropia glaziovii* (CG) inibiram a produção dos metabólitos do metoprolol pela enzima CYP2D6. A partir da curva de inibição foi possível determinar o perfil inibitório dos extratos e a IC_{50} , que foi de 384,3 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de chá-verde e de 396,0 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de embaúba.

A caracterização dos constituintes majoritários dos extratos CSi e CG por CLUE-EM/EM demonstrou que ambos possuíam compostos caracteristicamente encontrados nas suas espécies de origem, tendo em comum entre os extratos a presença de catequinas em suas composições (COSTA et al., 2011; FANG et al., 2017; TANAE et al., 2007). Considerando a similaridade dos resultados obtidos, as catequinas poderiam ser os compostos responsáveis pela inibição da CYP2D6 observada, porém outros compostos presentes nos extratos podem estar envolvidos na atividade observada.

Os dados na literatura sobre a inibição de enzimas CYP450 pelo chá-verde são divergentes e a ocorrência de interações envolvendo esse extrato bastante discutida (ALBASSAM; MARKOWITZ, 2017). Embora o extrato de *Camellia sinensis* já tenha sido investigado em outros trabalhos como inibidor da CYP2D6 (DONOVAN et al., 2004; MISAKA et al, 2013), de acordo

com pesquisas realizadas nos bancos de dados PubMed e Scopus, esse é o primeiro estudo que relata a inibição da atividade da CYP2D6 pelo extrato de *Cecropia glaziovii*.

Contudo, para a confirmação da importância clínica das interações aqui descritas, são necessários estudos complementares *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALBASSAM, A. A.; MARKOWITZ, J. S. An Appraisal of Drug-Drug Interactions with Green Tea (*Camellia sinensis*). **Planta Med**, v. 83, n. 6, p. 496-508, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28118673> >.

BASINSKA-ZIOBRON, A.; DANIEL, W. A.; WOJCIKOWSKI, J. Inhibition of human cytochrome P450 isoenzymes by a phenothiazine neuroleptic levomepromazine: An *in vitro* study. **Pharmacol Rep**, v. 67, n. 6, p. 1178-82, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26481538> >.

CASTELL, J. V. et al. Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 2, n. 2, p. 183-212, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16866607> >.

COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532011000600014 >.

CRESPI, C. L. et al. Comparison of substrate metabolism by wild type CYP2D6 protein and a variant containing methionine, not valine, at position 374. **Pharmacogenetics**, v. 5, n. 4, p. 234-43, 1995. Disponível em: < <https://europepmc.org/abstract/med/8528270> >.

DONOVAN, J. L. et al. Green tea (*Camellia sinensis*) extract does not alter cytochrome p450 3A4 or 2D6 activity in healthy volunteers. **Drug Metab Dispos**, v. 32, n. 9, p. 906-8, 2004.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15319329> >.

FAHMI, O. A.; RIPP, S. L. Evaluation of models for predicting drug-drug interactions due to induction. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 6, n. 11, p. 1399-416, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20955108> >.

FANG, R. et al. Variation of theanine, phenolic, and methylxanthine compounds in 21 cultivars of *Camellia sinensis* harvested in different seasons. **Food Chem**, v. 220, p. 517-526, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27855934> >.

FDA (Food and Drug Administration). **Guidance for Industry Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations**. U.S. Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration: 2012. 79 p.

LI, A. P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 6, n. 7, p. 357-66, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11267922> >.

LIU, Y.; SANTILLO, M. F. Cytochrome P450 2D6 and 3A4 enzyme inhibition by amine stimulants in dietary supplements. **Drug Test Anal**, v. 8, n. 3-4, p. 307-10, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26360628> >.

MISAKA, S. et al. Effects of Green Tea Catechins on Cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A Activities in Human Liver and Intestinal Microsomes. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 28, n. 3, p. 244-249, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268924> >.

MOOIMAN, K. D. et al. The effect of complementary and alternative medicines on CYP3A4-mediated metabolism of three different substrates: 7-benzoyloxy-4-trifluoromethyl-coumarin, midazolam and docetaxel. **J Pharm Pharmacol**, v. 66, n. 6, p. 865-

74, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392691> >.

NOMEIR, A. A. et al. Inhibition of CYP3A4 in a rapid microtiter plate assay using recombinant enzyme and in human liver microsomes using conventional substrates. **Drug Metab Dispos**, v. 29, n. 5, p. 748-53, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11302943> >.

SCHMIEDLIN-REN, P. et al. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3. **Mol Pharmacol**, v. 51, n. 5, p. 741-54, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9145912> >.

TANAE, M. M. et al. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 309-13, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17434301> >.

TSUJIMOTO, M. et al. Inhibitory Effects of Vegetable Juices on CYP3A4 Activity in Recombinant CYP3A4 and LS180 Cells. **Biol Pharm Bull**, v. 39, n. 9, p. 1482-7, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27582329> >.

TUCKER, G. T.; HOUSTON, J. B.; HUANG, S. M. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-toward a consensus. **Pharm Res**, v. 18, n. 8, p. 1071-80, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587475> >.

CAPÍTULO V

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE DOIS SISTEMAS
CELULARES REPÓRTERES PARA ANÁLISE DA
MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS
CYP3A4 E CYP2D6 PELOS EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS EM ESTUDO**

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste Capítulo são apresentados os resultados da modulação da expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 em células Caco-2 pelos extratos de plantas medicinais em estudo. Para esse fim, foram desenvolvidos dois sistemas repórteres baseados na expressão da proteína GFP, os quais também são descritos neste Capítulo.

Para os sistemas celulares repórteres desenvolvidos foram efetuadas duas solicitações de pedido de patente para a Secretaria de Inovação (SINOVA) desta Universidade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram utilizados os extratos secos das plantas medicinais *Cynara scolymus*; *Matricaria recutita*; *Camellia sinensis*; *Cecropia glaziovii*; *Echinacea* sp.; *Cimicifuga racemosa*; *Ilex paraguariensis*; *Ginkgo biloba*; *Bauhinia forficata* e *Glycine max* para este estudo. Dados específicos sobre os extratos, bem como seus fornecedores estão descritos no Capítulo II. O fármaco rifampicina foi adquirido da Sigma-Aldrich. Os reagentes utilizados para a cultura celular foram os mesmos descritos no Capítulo III.

2.2 Cultura de células Caco-2

As condições de cultura seguiram as mesmas previamente descritas no Capítulo III. Resumidamente, as células Caco-2 (#HTB-37) foram mantidas em meio DMEM contendo alto teor de glicose (4,5 g/L), suplementado com 10% de SFB e 1% de L-glutamina e de aminoácidos não essenciais. As células foram incubadas nas condições padrão de cultivo (37°C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida) até atingirem a confluência de 80%. Após a propagação celular, as células foram subcultivadas em placas de 6 e 12 cavidades, nas concentrações de 3,6 x 10⁵ células/cavidade e 2,5 x 10⁵ células/cavidade para uso na transfecção celular e nos testes de modulação da expressão, respectivamente. Durante a manutenção das células em placas, foi adicionado 1% de PS ao meio de cultura.

2.3 Desenho dos iniciadores

Com base em dados da literatura (AL-DOSARI et al., 2006; CAIRNS et al., 1996; GOODWIN; HODGSON; LIDDLE, 1999; HASHIMOTO et al., 1993) e no banco de dados GenBank, foram desenhados iniciadores específicos para as regiões promotoras dos genes das enzimas do citocromo P450, CYP3A4 e CYP2D6, utilizando os programas PrimerSelect, Versão 7.0.0, BioEdit Sequence Alignment Editor, Versão 7.1.3.0, e FastPCR Professional. As sequências dos iniciadores podem ser visualizadas no Quadro V. 1.

Quadro V. 1 - Iniciadores utilizados para a produção dos sistemas repórteres CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1.

Identificação	Sequência	Tamanho do produto	Enzima de restrição	GenBank
CYP3A4-F	5'-CTGA <u>ATTCGA</u> AGGCTCTGTCTGTC-3'	733 pb	EcoRI	NC_000007.14
CYP3A4-R	5'-CGCGGATCCTGAACATCTTTTTTG-3'		BamHI	NC_000007.14
CYP2D6-F	5'-TCGAGCTCTGCCCTCCACAAAAG-3'	764 pb	SacI	NC_000022.11
CYP2D6-R	5'-GACCGCGGTCCTCCTCCACTG-3'		SacII	NC_000022.11

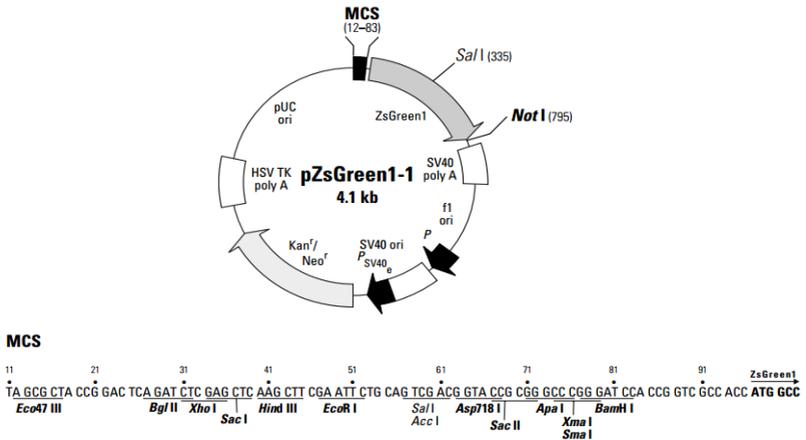
As regiões sublinhadas representam os sítios de restrição para as enzimas EcoRI (GAATTC), BamHI (GGATCC), SacI (GAGCTC) e SacII (CCGCGG). A localização no genoma foi efetuada com base no banco de dados GenBank.

2.4 Vetor

Os vetores utilizados para a transfecção celular, CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1, foram construídos pela inserção de fragmentos amplificados correspondentes às regiões promotoras dos genes das enzimas CYP3A4 ou CYP2D6 no sítio múltiplo de clonagem do vetor comercial pZsGreen1-1 (Clontech) (Figura V. 1), que antecede o gene codificador da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) derivada de *Zoanthus* sp. O vetor pZsGreen1-1 é desprovido de região promotora reguladora da transcrição da GFP, possui origens de replicação SV40 e pUC, e um gene (*Neo_r*) que confere resistência à neomicina/kanamicina. Vetores sem inserção de promotores reguladores da expressão da GFP foram utilizados como controle.

Figura V. 1 - Ilustração da estrutura do vetor pZsGreen1-1 e da localização dos sítios de restrição no sítio múltiplo de clonagem.

pZsGreen1-1 Vector



Fonte: Clontech.

2.5 Extração e amplificação do DNA

O DNA das células Caco-2 foi extraído pelo método fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook e Russel (2001), a partir de aproximadamente 5×10^5 células.

Após a extração, a amplificação dos produtos foi efetuada com 1 U da enzima GoTaq® Flexi DNA polymerase em tampão GoTaq Flexi Buffer 5 x (Promega), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP (Desoxinucleotídeos trifosfato), 2,5 µM de cada iniciador e de 70-90 ng de DNA molde em reações com volume de 25 µL. As ciclagens foram executadas em termociclador Techne (Flexigene) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min; hibridização a 59,2°C para CYP2D6 ou 58°C para CYP3A4 por 1 min; extensão a 72°C por 30 s e extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% + 2% de GelRed™ e analisados utilizando o fotodocumentador MiniBIS Pro associado ao programa Gel Capture, Versão 6.6 (DNR Bio - Imaging Systems).

Os produtos de PCR correspondentes às sequências da CYP2D6 foram extraídos do gel de agarose 1% e purificados utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), seguindo recomendações do fabricante, para posterior digestão. Os produtos de PCR correspondentes às sequências da CYP3A4 foram submetidos diretamente à reação de digestão.

2.6 Digestão dos produtos de PCR (CYP3A4 e CYP2D6) e do vetor pZsGreen1-1

A quantidade de material obtido por PCR foi quantificada utilizando o equipamento NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Science).

As enzimas de restrição foram escolhidas após análise das sequências dos produtos de PCR e do vetor com o sistema *online* NEBCutter V2.0 (New England BioLabs® Inc.). As enzimas de restrição utilizadas e suas quantidades para a digestão das sequências de DNA estão dispostas no Quadro V. 2. Para as reações com as enzimas EcoRI e BamHI foram usados 2 µg de BSA acetilado e o tampão de digestão MULTI – CORE™ 10 x, que proporciona atividade enzimática de 100% para a enzima EcoRI e entre 75 e 100% para a enzima BamHI. Para as reações com as enzimas SacI e SacII foi utilizado o tampão de digestão CutSmart®, que propicia atividade enzimática de 100% para ambas as enzimas.

As reações de 20 µL foram mantidas por 1 h a 37°C quando incubadas com as enzimas EcoRI e BamHI e por 2 h a 37°C

quando incubadas com as enzimas *SacI* e *SacII*. As incubações foram efetuadas em banho seco Thermomixer® Confort (Eppendorf) e, ao final da digestão, as enzimas foram inativadas a 65°C por 20 min.

Quadro V. 2 - Particularidades das reações de digestão dos produtos de PCR (CYP3A4 e CYP2D6) e do vetor ZsGreen1-1.

	Quantidade de DNA	Tampão de reação e suplementação	Enzimas (Promega®)	
			EcoRI	BamHI
Produto CYP3A4	1000 ng	MULTI – CORE™	4,5 U	4,5 U
pZsGreen1-1	279 ng	2 µg de BSA acetilado	2 U	2 U
	Quantidade de DNA	Tampão de reação	Enzimas (New England BioLabs®)	
			<i>SacI</i>	<i>SacII</i>
Produto CYP2D6	1000 ng	CutSmart®	10 U	10 U
pZsGreen1-1	268 ng		3 U	3 U

2.7 Ligação produtos-vetor

A ligação dos insertos (CYP3A4 ou CYP2D6) ao vetor (pZsGreen1-1) foi efetuada com 6 U da enzima T4 DNA Ligase (5 U/µL) (Fermentas) em reações de 20 µL. Para a ligação foi utilizada a proporção vetor-inserto digerido 1:2 (p/p). As reações foram incubadas a 22°C em banho seco durante 1 h e posteriormente a enzima T4 DNA Ligase foi inativada a 65°C por 10 min.

2.8 Transformação e criopreservação bacteriana

Os vetores resultantes das reações de ligação (CYP3A4 ZsGreen1-1; CYP2D6 ZsGreen1-1 e ZsGreen1-1) foram usados para a transformação de bactérias *Escherichia coli* cálcio competentes DH5α (Invitrogen), cedidas pela Professora Patrícia Hermes Stoco (Laboratório de Protozoologia, MIP, CCB, UFSC). Aproximadamente 200 µL da suspensão de bactérias foram

homogeneizadas com 10 µL de cada reação de ligação e submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 s. Após, foram adicionados 400 µL de meio de crescimento SOC (2,0 g Bacto®-tryptone, 0,5 g de Bacto®-yeast, 1 mL de NaCl 1M, 0,25 mL de KCl 1M, 1 mL de Mg²⁺ 2M e 1 mL de glicose 2M) às suspensões, que foram incubadas por 1 h a 37°C sob agitação a 100 rpm. Finalizada a incubação, as bactérias foram plaqueadas em meio ágar LB (Luria – Bertani) contendo 100 µg/mL de kanamicina e incubadas a 37°C de 16-21 h para seleção das bactérias recombinantes.

A clonagem foi confirmada por PCR diretamente das colônias adotando as mesmas condições da PCR já descritas. As colônias de interesse foram repicadas em tubos contendo meio LB com 100 µg/mL de kanamicina e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 h. Em seguida as bactérias foram criopreservadas em glicerol 30% a - 80°C.

O DNA plasmidial utilizado para a transfecção celular foi extraído das bactérias transformadas com o kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

2.9 Transfecção das células Caco-2 e criopreservação

Placas de 6 cavidades contendo 3,6 x 10⁵ células/cavidade, mantidas em DMEM contendo 4,5 g/L de glicose, 10% de SFB e 1% de L-glutamina e aminoácidos não essenciais, foram preparadas 24 h anteriormente à transfecção e incubadas até confluência de 50-80%. As células foram transfectadas pelo método utilizando lipofectamina com o kit Xfect™ Transfection Reagent (Clontech), seguindo as recomendações do fabricante. Para a transfecção foram utilizados 200 µL de DNA plasmidial (5 µg) + Xfect Polymer em Xfect Buffer por cavidade. As células foram incubadas por 4 h e o meio substituído por meio DMEM contendo 4,5 g/L de glicose fresco suplementado. As células foram mantidas por 24 h nas condições padrão de cultivo e o início na seleção dos clones foi efetuada com 800 µg/mL de Geneticin® (G418, Thermo Fisher Scientific). O meio de cultivo contendo G418 foi substituído a cada dois dias durante 15 dias.

Os clones recombinantes selecionados foram propagados em garrafas de cultivo celular até confluência máxima de 80% para criopreservação em solução de SFB contendo 10% de DMSO

(Dimetilsulfóxido - Vetec™ 99,9%) em nitrogênio líquido até a utilização.

2.10 Análises da modulação dos sistemas repórteres

As células Caco-2 transfectadas foram semeadas em placas de 12 cavidades ($2,5 \times 10^5$ células/cavidade) e mantidas nas condições padrão de cultivo em meio suplementado com G418 (200 µg/mL), por 48 h ou de 21-25 dias anteriormente aos ensaios de modulação da expressão, com troca do meio suplementado contendo G418 a cada dois dias.

Os extratos padronizados foram solubilizados em DMEM contendo 4,5 g/L de glicose, 1% de PS e filtrados assepticamente em membrana de 0,22 µm. O fármaco rifampicina, utilizado como controle positivo de indução, foi solubilizado em DMSO e diluído para a concentração de 100 µM em meio DMEM (concentração final de DMSO < 1%). As amostras foram adicionadas nas células, as quais foram incubadas por 24 ou 48 h (Quadro V. 3). Após a incubação as células foram lavadas com PBS e dissociadas com PBS acrescido de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5 mM gelado. As células foram homogeneizadas e a expressão da fluorescência analisada por citometria de fluxo, com aquisição de 10.000 eventos, no Citômetro de Fluxo BD FACSCanto™ II - Laser azul (488 nm). Os resultados foram processados utilizando o programa Flowing, Versão 2.5.0.

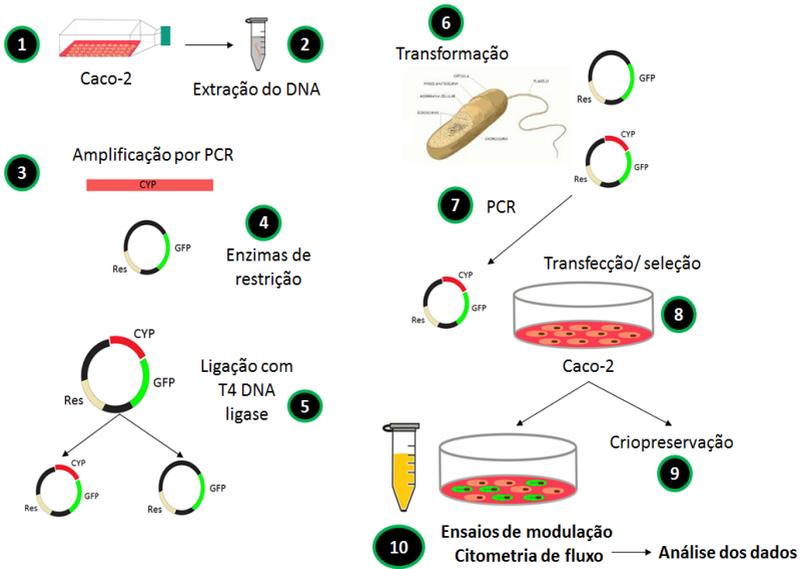
As monocamadas celulares foram avaliadas também por microscopia de fluorescência em microscópio Olympus IX71 com fluorescência adaptada (Excitação/Emissão 460-490/520) e sistema de captura de imagem Cell^P (Olympus).

Um resumo das técnicas utilizadas no desenvolvimento e do método de análise da modulação dos sistemas repórteres pode ser visualizada na Figura V. 2.

Quadro V. 3 - Condições experimentais utilizadas nos ensaios de modulação dos sistemas repórteres.

Amostra	Código	Nome popular	Células não diferenciadas	Células diferenciadas
			Concentração Incubação por 24 h	Concentração Incubação por 48 h
<i>Cynara scolymus</i>	CSc	Alcachofra	500 µg/mL	500 µg/mL
<i>Matricaria recutita</i>	MR	Camomila	500 µg/mL	500 µg/mL
<i>Camellia sinensis</i>	CSi	Chá-verde	500 µg/mL	300 µg/mL
<i>Cecropia glaziovii</i>	CG	Embaúba	500 µg/mL	100 µg/mL
<i>Echinacea</i> sp.	EQ	Equinácea	500 µg/mL	500 µg/mL
<i>Cimicifuga racemosa</i>	CR	Erva-de-são-cristóvão	500 µg/mL	500 µg/mL
<i>Ilex paraguariensis</i>	IP	Eva-mate	500 µg/mL	200 µg/mL
<i>Ginkgo biloba</i>	GB	Ginco	500 µg/mL	500 µg/mL
<i>Bauhinia forficata</i>	BF	Pata-de-vaca	500 µg/mL	400 µg/mL
<i>Glycine max</i>	GM	Soja	500 µg/mL	500 µg/mL
Rifampicina	Rif	-	100 µM	100 µM

Figura V. 2 - Esquema das técnicas utilizadas no desenvolvimento e do método de análise da modulação dos sistemas repórteres.



Fonte: A autora.

2.11 Análise estatística

Os dados foram analisados nos programas Microsoft Excel® 2016 e GraphPad Prism, Versão 5 utilizando ANOVA uma via com pós-teste de Dunnett com intervalo de confiança de 95%, ou teste *t* de Student.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento dos sistemas repórteres

Os dois sistemas repórteres desenvolvidos utilizando células Caco-2 foram empregados para avaliar a modulação da expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 após exposição aos extratos das plantas medicinais em estudo. O uso de sistemas repórteres possibilita o acompanhamento de processos celulares

por meio da expressão de uma proteína repórter (FAHMI; RIPP, 2010; GRIMM, 2004).

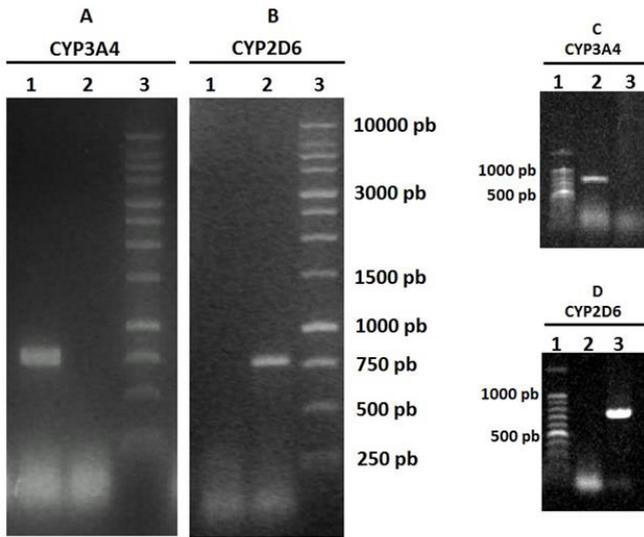
A inserção das sequências das regiões promotoras, anteriormente à região codificadora da GFP, submete a expressão dessa proteína à regulação sofrida pelos promotores dos genes das enzimas celulares CYP3A4 ou CYP2D6. Desta forma, alterações na expressão dos genes que codificam as enzimas celulares alteram também a expressão da GFP nas células transfectadas.

Originalmente descoberta em um organismo marinho (*Aequorea victoria*), a GFP é a cromoproteína mais utilizada atualmente em pesquisas biomédicas, biológicas e biotecnológicas. O emprego de proteínas com fluorescência em sistemas repórteres permite a sua mensuração por leitores de fluorescência ou por citometria de fluxo, e também sua análise qualitativa por microscopia de fluorescência (CHUDAKOV et al., 2010).

Neste trabalho, a GFP expressa foi quantificada por citometria de fluxo, o que possibilitou estimar a ocorrência de indução ou inibição da expressão dos genes das enzimas de forma indireta. Assim, após o tratamento das células, foi possível estabelecer relações entre as interações entre plantas medicinais e fármacos na expressão gênica das enzimas metabólicas em estudo.

A amplificação das sequências de interesse correspondentes as regiões promotoras dos genes das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 pode ser visualizada na Figura V. 3A e B. Após a produção dos vetores, os mesmos foram selecionados em bactérias, a confirmação da clonagem foi efetuada por PCR direta de colônia. As amostras analisadas em gel de agarose 1% apresentaram bandas específicas para os produtos de interesse com os tamanhos esperados, conforme apresentado na Figura V. 3C e D.

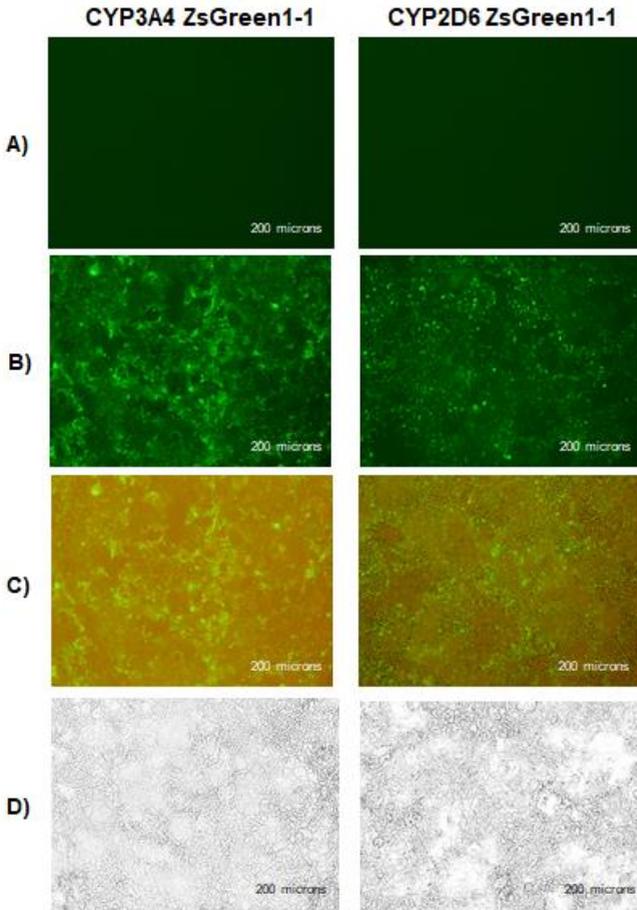
Figura V. 3 - Eletroforese dos produtos de PCR, CYP3A4 e CYP2D6, em gel de agarose 1%.



(A) Produto de PCR CYP3A4 (coluna 1), controle negativo (coluna 2), padrão de peso molecular 1 Kb (Promega) (coluna 3). (B) Controle negativo (coluna 1), produto de PCR CYP2D6 (coluna 2), padrão de peso molecular 1 Kb (Promega) (coluna 3). (C) Padrão de peso molecular 100 pb (Promega) (coluna 1), produto de PCR CYP3A4 (coluna 2), controle negativo (coluna 3). (D) Padrão de peso molecular 100 pb (Promega) (coluna 1), controle negativo (coluna 2), produto de PCR CYP2D6 (coluna 3).

Após a confirmação da adequada amplificação, clonagem, transfecção das células Caco-2 e seleção, os sistemas repórteres foram analisados por microscopia de fluorescência. Células pré-incubadas por 48 h e de 21-25 dias exibiram expressão da GFP quando comparadas ao sistema controle, o qual possui apenas os vetores sem inserto. Células transfectadas expressando GFP podem ser visualizadas no exemplo apresentado na Figura V. 4.

Figura V. 4 - Microscopia da monocamada de células dos sistemas repórteres CYP3A4 e CYP2D6 em comparação ao controle ZsGreen1-1.



(A) Controle negativo (ZsGreen1-1). **(B)** Microscopia de fluorescência excitação/emissão 460-490/520 - células expressando GFP. **(C)** Sobreposição de imagens - campo claro e fluorescência. **(D)** Monocamada de células Caco-2 em campo claro em preto e branco. Imagens referentes a células incubadas por 21-25 dias sem aplicação de nenhum tratamento. As imagens **B**, **C** e **D** foram adquiridas em mesmo campo. As imagens **D** permite a visualização do contorno e da organização das células na monocamada celular.

3.2 Análise da funcionalidade dos sistemas CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1 por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia multiparamétrica para análises simultâneas de células individuais, gerando dados sobre a complexidade, tamanho e marcação dessas células (SHAPIRO, 2003).

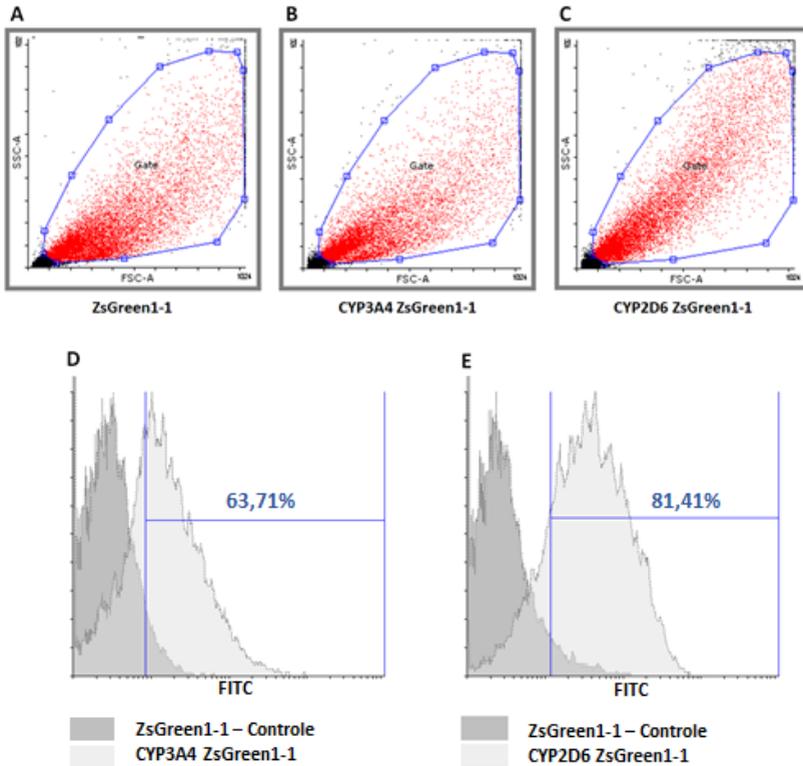
As células dos sistemas repórteres não tratadas foram analisadas por citometria de fluxo, detalhes podem ser vistos na Figura V. 5. Na sobreposição de histogramas observa-se o deslocamento do pico dos sistemas CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1, quando comparado aos respectivos controles, resultante do aparecimento da fluorescência nas células transfectadas.

A confluência e o tempo de incubação são determinantes para o processo de diferenciação das células Caco-2, no qual ocorre a formação das junções oclusivas e a expressão de transportadores e proteínas característicos das células diferenciadas. A redução no tempo de incubação celular tem implicação direta na expressão de proteínas celulares e, conseqüentemente, poderia afetar a funcionalidade dos sistemas repórteres desenvolvidos neste trabalho (FERRUZZA et al., 2012; NATOLI et al., 2012). Assim, as células pré-incubadas por 48h (não diferenciadas) e as pré-incubadas por 21-25 dias (diferenciadas) foram analisadas por citometria de fluxo a fim de verificar a importância do tempo de pré-incubação/diferenciação celular na expressão da fluorescência.

Como observado na Figura V. 6 foi verificada diferença significativa na expressão da fluorescência tanto para o sistema CYP3A4 ZsGreen1-1 ($p > 0,0001$) como para o sistema CYP2D6 ZsGreen1-1 ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$) em relação ao controle nos dois tempos de pré-incubação avaliados.

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na expressão da fluorescência entre os tempos de pré-incubação para o sistema CYP3A4 ZsGreen1-1, entretanto diferença significativa entre os tempos de pré-incubação foi visualizada para o sistema CYP2D6 ZsGreen1-1 ($p < 0,0001$). Esses dados indicam que a diferenciação celular tem efeito importante na expressão da GFP para o sistema CYP2D6 ZsGreen1-1, não ocorrendo o mesmo para o sistema CYP3A4 ZsGreen1-1.

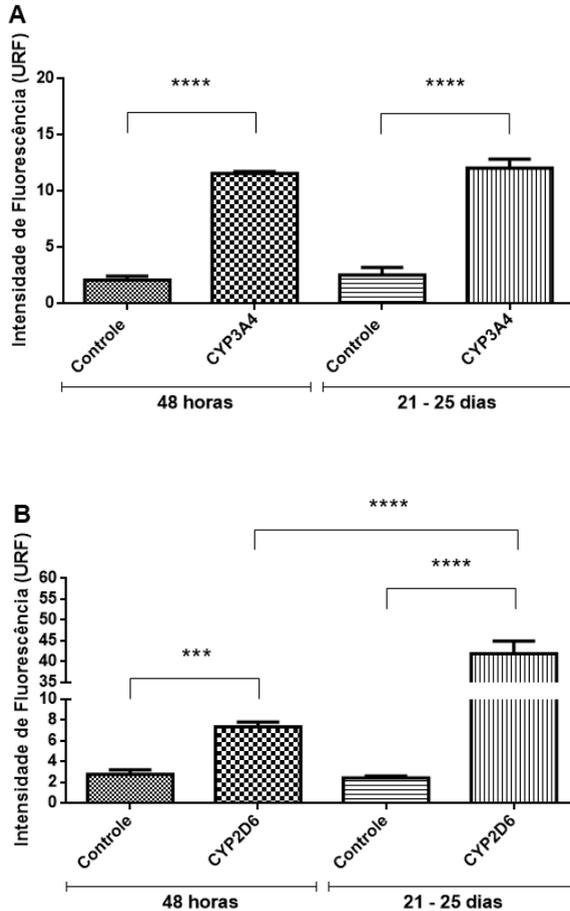
Figura V. 5 - *Dot plots* e histogramas obtidos por citometria de fluxo para os sistemas repórteres.



Fonte: A autora.

Os *Dot plots* estão representados em tamanho celular FSC-A (*Forward Scatter*) versus complexidade celular SSC-A (*Side Scatter*). *Dot plots* mostrando a região do *gate* utilizada para a análise do sistema controle (A), do sistema CYP3A4 ZsGreen1-1 (B) e do sistema CYP2D6 ZsGreen1-1 (C). Nos histogramas, a região em cinza escuro representa a fluorescência dos controles e a região em cinza claro a dos sistemas repórteres CYP3A4 ZsGreen1-1 (D) e CYP2D6 ZsGreen1-1 (E). A porcentagem de marcação das células expressa nos histogramas considerou demarcação do limite em 5% do controle negativo.

Figura V. 6 - Intensidade de fluorescência dos sistemas repórter após 48 h e 21-25 dias de pré-incubação.



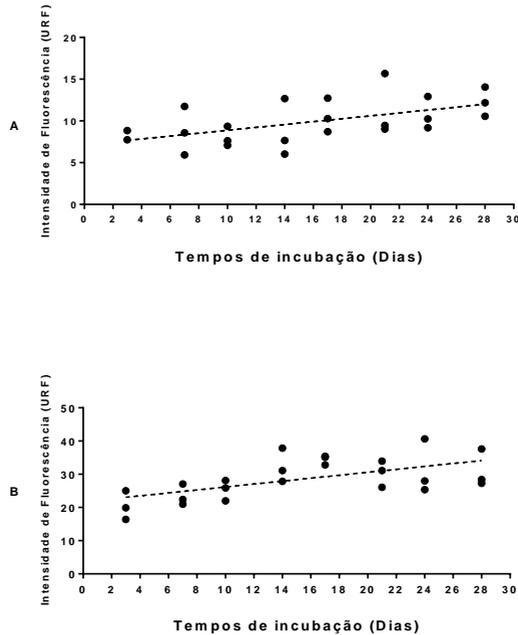
(A) CYP3A4 (B) CYP2D6. Os dados estão representados em sistemas/tempo de incubação *versus* URF (Unidades Relativas de Fluorescência). Os dados correspondem a três experimentos independentes, foram obtidos a partir dos dados da média geométrica da intensidade de fluorescência e analisados por teste *t* de Student em comparação com os respectivos controles (Zsgreen1-1). O intervalo de confiança adotado foi de 95%. **** ($p < 0,0001$); *** ($p < 0,001$).

Sabe-se que a expressão do gene que codifica a enzima CYP2D6 é submetida à regulação epigenética por meio de metilação do DNA e modificações nas histonas (PARK et al., 2015). Assim, a mudança observada na expressão da fluorescência do sistema CYP2D6 ZsGreen1-1, de acordo com o estado de diferenciação celular, poderia acontecer por alterações na expressão ou atividade de proteínas regulatórias ocorridas devido à diferenciação celular (FARKAS et al., 2015).

Além de expressarem fluorescência, é de extrema importância que as células mantenham o nível de expressão no decorrer do tempo necessário para a diferenciação celular, permitindo a execução dos ensaios de modulação após 21-25 dias de pré-incubação. Assim, foi avaliada a capacidade das células em manterem a fluorescência utilizando uma curva de tempo com incubação das células por 28 dias. No decorrer do tempo foi mensurada a expressão da GFP pelas células em diferenciação. Os dados obtidos podem ser visualizados na Figura V. 7.

Pode-se observar que a expressão da fluorescência se manteve estável ou aumentou durante o período de incubação. Sendo assim, conclui-se que os sistemas apresentam estabilidade suficiente para análises após o período de pré-incubação necessário para a diferenciação celular sem comprometimento da expressão de GFP.

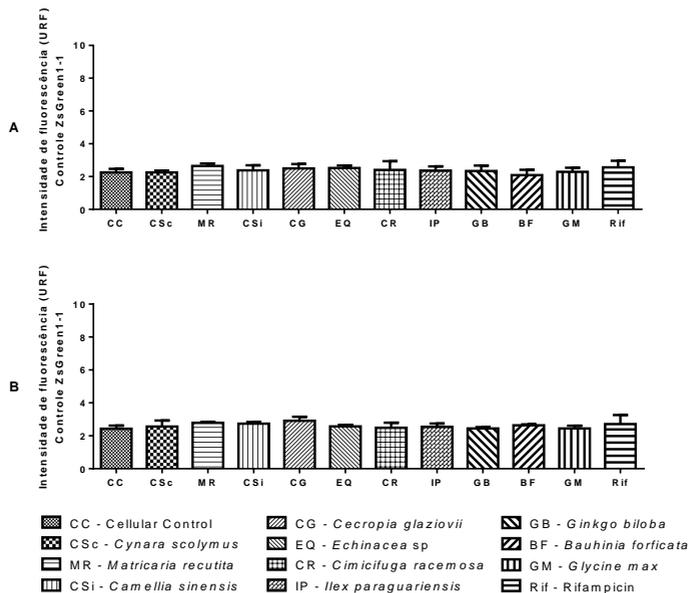
Figura V. 7 - Curva de tempo de pré-incubação dos sistemas (A) CYP3A4 ZsGreen1-1 (B) CYP2D6 ZsGreen1-1.



Dados apresentados em tempo de incubação em dias *versus* URF (Unidades Relativas de Fluorescência). Cada ponto representa um experimento independente ($n = 3$).

Para as análises de modulação, além da manutenção da expressão da GFP, é importante que as amostras em teste não interfiram nas leituras de fluorescência por citometria de fluxo. De tal modo, as células do controle (ZsGreen1-1) tratadas com os diferentes extratos e com a rifampicina foram analisadas por citometria de fluxo. Como pode ser visto na Figura V. 8, não foram detectadas diferenças estatísticas na fluorescência das células tratadas ($p > 0,05$) em comparação com o controle celular não tratado, tanto para células não diferenciadas (pré-incubação de 48 h) ou diferenciadas (pré-incubação de 21-25 dias). Esses dados indicam que os tratamentos não alteraram a expressão basal de fluorescência das células Caco-2 e não comprometeram a obtenção dos dados no canal de leitura da fluorescência.

Figura V. 8 - Expressão de fluorescência do sistema controle (ZsGreen1-1) tratado com as diferentes amostras após 48 h (A) e 21-25 (B) dias de pré-incubação das células Caco-2.



Dados apresentados em tratamentos aplicados *versus* intensidade de fluorescência em URF (Unidades Relativas de Fluorescência). Os dados correspondem a três experimentos independentes e foram analisados por ANOVA uma via com pós-teste de Dunnett e intervalo de confiança de 95%. Não foi verificada diferença estatística para nenhum dos tratamentos aplicados em relação ao controle celular (CC) em nenhum dos tempos de pré-incubação analisados ($p > 0,05$). Os tratamentos foram aplicados por 24 h em células pré-incubadas por 48 h e por 48 h em células pré-incubadas por 21-25 dias.

3.3 Indução dos sistemas CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1 pelo fármaco rifampicina

A rifampicina é um antibiótico utilizado como indutor clássico da expressão da CYP3A4 para estudos *in vitro* do metabolismo enzimático (BADOLO et al., 2015; CHARITÉ, 2017; FDA, 2012). A expressão da CYP3A4 é induzida por diversos fármacos (ALMAZROO et al., 2017; CHARITÉ, 2018), diferentemente do

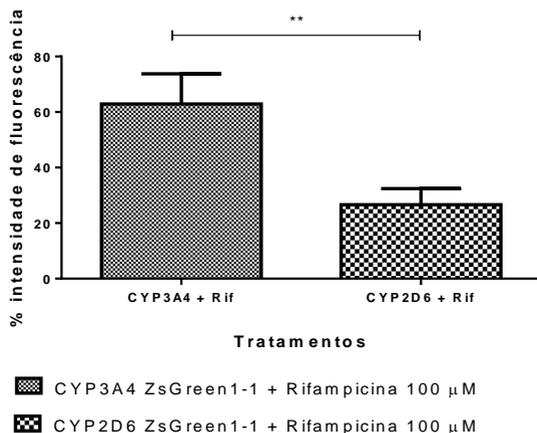
que ocorre com a CYP2D6, que é induzida por um restrito número de xenobióticos *in vitro*. A rifampicina é comumente utilizada como controle positivo em estudos de expressão e atividade da CYP2D6 (FAROOQ; KELLY; UNADKAT, 2016; HELLUM; NILSEN, 2007), tendo sido utilizada também neste trabalho. Esse fármaco aumentou a expressão da fluorescência dos dois sistemas repórteres tanto em células diferenciadas como não diferenciadas, quando comparadas aos controles não tratados.

Em células diferenciadas, pré-incubadas por 21-25 dias, a indução da CYP2D6 pela rifampicina foi significativamente maior que a do controle celular ($p < 0,01$), porém significativamente menor do que a indução da CYP3A4 ($p < 0,01$) (Figura V. 9). Resultados semelhantes foram observados por Ramamoorthy e colaboradores (2013) usando hepatócitos, nos quais a rifampicina induziu fortemente a expressão de CYP3A4 e fracamente a expressão da CYP2D6.

Embora ocorra a indução da expressão da CYP3A4 pela rifampicina, o exato mecanismo de como isso acontece não é completamente compreendido. É descrito que a indução da expressão da CYP3A4 pela rifampicina ocorre via o receptor nuclear PXR (*Pregnane X Receptor*) e com participação do fator HNF-4 α (*Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*), sendo o sinergismo entre o receptor nuclear e o fator HNF-4 α importante para a indução da expressão enzimática (KAMIYAMA et al., 2007; LI; CHIANG, 2006; SMITH et al., 2014; TIRONA et al., 2003).

Como as células Caco-2 expressam HNF-4 α , um dos conhecidos fatores de transcrição da CYP2D6, a indução da CYP2D6 sugestivamente poderia ocorrer pela mesma via utilizada para a CYP3A4 e/ou dividir fatores reguladores da via de expressão dessa enzima (HE et al., 2015; MARCIL et al., 2010; PAN; NING; JEONG, 2017). Foi demonstrado, utilizando-se RNAi para HNF-4 α , que uma redução do RNAm do HNF-4 α em hepatócitos humanos, reduz também a expressão de RNAm de CYP2D6, CYP3A4, PXR e CAR, reforçando a hipótese sugerida (KAMIYAMA et al., 2007).

Figura V. 9 - Expressão de fluorescência dos sistemas CYP3A4 ZsGreen1-1 e CYP2D6 ZsGreen1-1 após o tratamento de células diferenciadas com rifampicina 100 μ M.



Dados apresentados em % de fluorescência \pm desvio padrão. A figura representa análises de três experimentos independentes. Os dados foram normalizados pelos respectivos controles celulares não tratado (CYP3A4 ou CYP2D6 ZsGreen1-1) e analisados por teste *t* de Student com intervalo de confiança de 95%. Foi detectada diferença significativa ** ($p < 0,01$) entre a expressão da fluorescência dos dois sistemas tratados com rifampicina 100 μ M.

Outro fator que pode estar envolvido na modulação da expressão das enzimas metabólicas pela rifampicina é o fator *Small Heterodimer Partner* (SHP), pois é descrito na literatura que a rifampicina inibe a expressão do RNAm do SHP em hepatócitos humanos (LI; CHIANG, 2006). O SHP é um repressor de HNF-4 α , assim a inibição da expressão de SHP pela rifampicina poderia favorecer a atuação do HNF-4 α com conseqüente indução da expressão da CYP2D6 (HE et al., 2015). Apesar da hipótese levantada com base nessas informações, para a comprovação do mecanismo aqui sugerido são necessárias investigações mais detalhadas.

A rifampicina foi utilizada na concentração de 100 μ M nestes experimentos, uma concentração relativamente alta quando comparada com a empregada em outros estudos de indução da expressão enzimática (BADOLO et al., 2015; WANG et al., 2013).

Esta estratégia foi adotada com o intuito de promover a internalização e atividade desse fármaco nas células Caco-2, visto que elas superexpressam a proteína de efluxo P-gp e a rifampicina é um substrato dessa proteína (FROMM; KIM, 2011; MARQUEZ; VAN BAMBEKE, 2011). Outras concentrações foram avaliadas em testes preliminares e a concentração de 100 μM foi a mais efetiva na indução e não foi citotóxica para as células Caco-2 (dados não mostrados).

3.4 Análise da modulação dos sistemas repórteres em células não diferenciadas pelos extratos de plantas medicinais

Determinadas as características dos sistemas repórteres, as células Caco-2 transfectadas foram submetidas aos tratamentos com os extratos das plantas medicinais. A avaliação de células não diferenciadas visou estabelecer um método para testes rápidos de modulação da expressão das enzimas metabólicas. Ensaios farmacocinéticos rápidos são de interesse durante a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Como a maioria dos estudos com células Caco-2 exigem longos tempos de cultivo para a diferenciação celular, uma das desvantagem do uso de técnicas com essas células, um método que não necessitasse de diferenciação celular favoreceria a obtenção de resultados rápidos, de forma dinâmica e menos onerosa (AWORTWE; FASINU; ROSENKRANZ, 2014; HUBATSCH et al., 2007; LI, 2001).

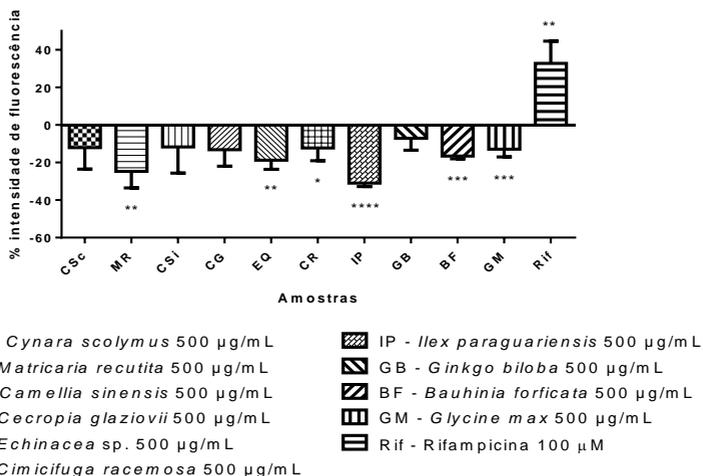
Os ensaios com células não diferenciadas foram efetuados após pré-incubação das células por 48 h e com aplicação posterior dos tratamentos. Esse tempo de pré-incubação foi empregado por ser o tempo necessário para a adesão celular e formação de uma monocamada celular homogênea nas cavidades das placas.

As concentrações dos extratos e da rifampicina utilizadas foram escolhidas com base em dados de citotoxicidade, conforme descrito no Capítulo II, e de solubilidade das amostras no meio de cultura.

Como pode ser visualizado na Figura V. 10, a maioria dos extratos testados inibiu a fluorescência expressa pelo sistema CYP3A4 ZsGreen1-1. Comparando os dados ao controle celular, foi verificada uma inibição significativa da expressão da fluorescência pelos extratos MR ($p < 0,01$), EQ ($p < 0,01$), CR ($p <$

0,05), IP ($p < 0,0001$), BF ($p < 0,001$) e GM ($p < 0,001$) e indução significativa utilizando o fármaco controle rifampicina ($p > 0,01$).

Figura V. 10 - Modulação da expressão da fluorescência após 24 h de tratamento das células não diferenciadas do sistema CYP3A4 ZsGreen1-1.



Dados apresentados em % de intensidade de fluorescência \pm desvio padrão. Os dados foram normalizados pelo controle celular não tratado (CYP3A4 ZsGreen1-1). A figura representa análises de três experimentos independentes, os quais foram avaliados por teste *t* de Student, com intervalo de confiança de 95%, comparando cada tratamento com o controle celular. Foi observada inibição significativa da expressão da fluorescência pelo tratamento com os extratos MR ** ($p < 0,01$), EQ ** ($p < 0,01$), CR * ($p < 0,05$), IP **** ($p < 0,0001$), BF *** ($p < 0,001$) e GM *** ($p < 0,001$). Indução significativa da expressão da fluorescência foi verificada com o tratamento com rifampicina ** ($p < 0,01$).

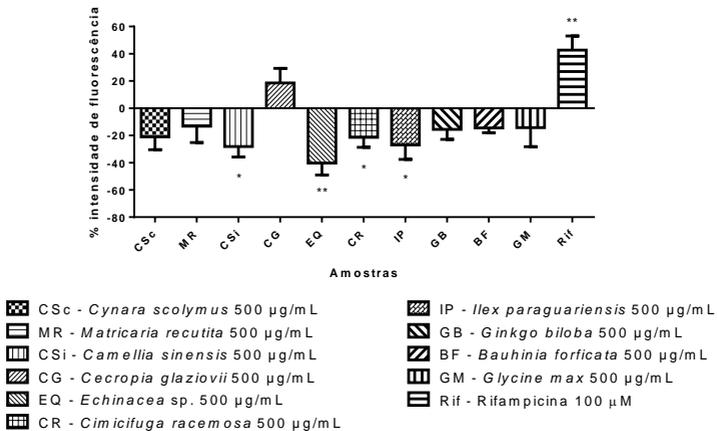
Na literatura, há relatos da ocorrência de indução da expressão da CYP3A4 pelo extrato de *Echinacea purpurea* em células HepG2 transfectadas com o receptor PXR (AWORTWE et al., 2015) e por extrato de *Cimicifuga racemosa* em modelo animal (PANG et al., 2011). Também foi relatada a inibição da expressão pelo extrato de *Glycine max* em fígado de ratos (BOGACZ et al., 2014; BOGACZ et al., 2010) e fraca inibição pelo extrato de

Cynara Scolymus, em células HepG2 (LÖHR; DETERS; HENSEL, 2009).

Relatos da modulação da expressão da CYP3A4 pelos extratos de *Ilex paraguariensis*, *Matricaria recutita*, *Cecropia glaziovii* e *Bauhinia forficata* não foram encontrados em levantamento nas bases de dados PubMed e Scopus, até o momento.

Da mesma forma que o observado utilizando o sistema CYP3A4 ZsGreen1-1 e apresentado na Figura V. 11, a maioria dos extratos testados inibiu a expressão da fluorescência do sistema repórter CYP2D6 ZsGreen1-1. Os extratos CSi ($p < 0,05$), EQ ($p < 0,01$), CR ($p < 0,05$) e IP ($p < 0,05$) inibiram significativamente a expressão de fluorescência do sistema CYP2D6 ZsGreen1-1.

Figura V. 11 - Modulação da expressão da fluorescência após 24 h de tratamento das células não diferenciadas do sistema CYP2D6 ZsGreen1-1.



Dados apresentados em % de intensidade de fluorescência \pm desvio padrão. Os dados foram normalizados pelo controle celular não tratado (CYP2D6 ZsGreen1-1). A figura representa análises de três experimentos independentes, os quais foram avaliados por teste *t* de Student, com intervalo de confiança de 95%, comparando cada tratamento com o controle celular. Foi observada inibição significativa da expressão da fluorescência pelo tratamento com os extratos Csi * ($p < 0,05$), EQ ** ($p < 0,01$), CR * ($p < 0,05$) e IP * ($p < 0,05$). Indução significativa da expressão de fluorescência foi verificada com o tratamento com rifampicina ** ($p < 0,01$).

Estudos sobre modulação da expressão gênica da CYP2D6 não foram encontrados nos bancos de dados consultados, até o momento. Apenas alguns estudos sobre modulação da atividade por plantas medicinais são descritos, como com *Camellia sinensis* e de compostos presentes nessa planta (MISAKA et al., 2013; SAVAI et al., 2015), bem como com *Echinacea* sp. e *Cimicifuga racemosa* (GURLEY et al., 2008; SEVIOR et al., 2010).

Divergências entre os resultados obtidos com o sistema CYP3A4 ZsGreen1-1 em relação aos dados de expressão da literatura foram verificadas. Essas inconsistências na resposta do sistema poderiam ocorrer devido ao uso de modelos e tipos celulares diferentes dos empregados neste trabalho, bem como devido a ausência de diferenciação das células Caco-2. A mesma comparação não pode ser feita para o sistema CYP2D6 ZsGreen1-1 pela falta de dados na literatura sobre a modulação da expressão da CYP2D6 pelos extratos em estudo.

Devido à ausência de indução da expressão, em especial da enzima CYP3A4, que possui diversos agentes indutores (CHARITÉ, 2018), foi avaliado o efeito dos tratamentos em células diferenciadas, pré-incubadas por 21-25 dias. Além do uso de células diferenciadas, o tempo de tratamento com os extratos foi estendido de 24 para 48 h, a fim de favorecer o efeito dos extratos e a produção de GFP.

Informações mais específicas sobre a modulação da expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 pelos extratos das plantas medicinais são discutidas a seguir e no Capítulo VI.

3.5 Análise da modulação dos sistemas repórteres em células diferenciadas pelos extratos das plantas medicinais

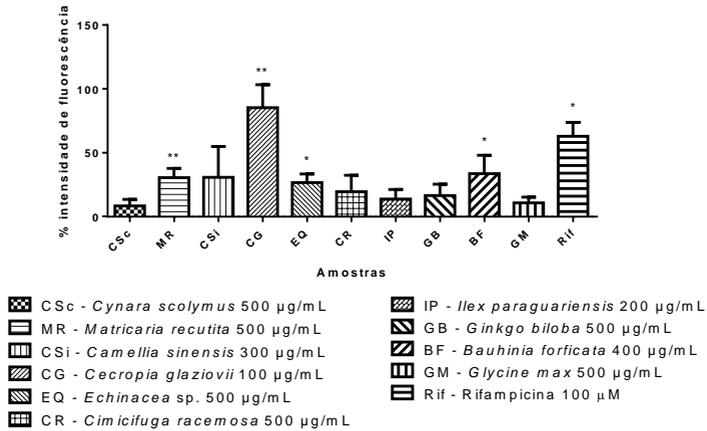
Para as análises de modulação utilizando células diferenciadas e o tempo de tratamento de 48 h, a concentração dos extratos foram ajustadas para níveis não citotóxicos. Nesta seção os resultados obtidos para cada sistema foram discutidos separadamente para melhor entendimento.

3.5.1 Sistema repórter CYP3A4 ZsGreen1-1

Ao contrário do verificado com células não diferenciadas, o sistema CYP3A4 ZsGreen1-1, após diferenciação celular, teve a expressão da fluorescência induzida por parte dos extratos

testados. Como pode ser visualizado na Figura V. 12, o extrato MR ($p < 0,01$), CG ($p < 0,01$), EQ ($p < 0,05$), BF ($p < 0,05$) e o fármaco rifampicina ($p < 0,05$) induziram significativamente a expressão da fluorescência em comparação ao controle celular.

Figura V. 12 - Modulação da expressão da fluorescência após 48 h de tratamento das células diferenciadas do sistema CYP3A4 ZsGreen1-1.



Dados apresentados em % de intensidade de fluorescência \pm desvio padrão. Os dados foram normalizados pelo controle celular não tratado (CYP3A4 ZsGreen1-1). A figura representa análises de três experimentos independentes, os quais foram avaliados por teste *t* de Student, com intervalo de confiança de 95%, comparando cada tratamento com o controle celular. Foi observada indução significativa da expressão da fluorescência para os extratos MR ** ($p < 0,01$), CG ** ($p < 0,01$), EQ * ($p < 0,05$) e BF * ($p < 0,05$). Indução significativa da expressão da fluorescência foi verificada com o tratamento com rifampicina * ($p < 0,05$).

A inibição *in vitro* da atividade da CYP3A4 pelo óleo essencial da camomila é descrita na literatura (GANZERA et al., 2006). Entretanto, um estudo com quercetina e rutina, flavonoides isolados da *Matricaria recutita*, demonstrou que esses compostos têm a capacidade de reduzir a biodisponibilidade da ciclosporina em ratos, em parte devido à indução da atividade da CYP3A4 (YU et al., 2011). Em relação a expressão, foi relatado aumento na expressão da CYP3A4 em hepatócitos e em células Caco-2

tratados com quercetina (CHAE et al., 2016; DROCOURT et al., 2002; RAUCY, 2003).

O extrato que demonstrou maior potência em induzir a expressão da CYP3A4 foi o extrato CG. Um dos compostos presentes no extrato de *Cecropia glaziovii*, o ácido clorogênico, já foi descrito como indutor da expressão da CYP3A4 (COSTA et al., 2011; LI et al., 2010). Li e colaboradores (2010) detectaram um aumento de 2,5 vezes na expressão de RNAm da CYP3A4 em células LS174T (células de adenocarcinoma epitelial de cólon humano) quando tratadas com 0,1 μM de ácido clorogênico, demonstrando a potência relativa desse composto.

Assim, a indução da expressão de CYP3A4 observada com células diferenciadas do sistema CYP3A4 ZsGreen1-1 pelos extratos de camomila (MR) e de embaúba (CG) podem ser resultantes da atividade dos metabólitos secundários descritos, concordando com o disposto na literatura.

Modadai e colaboradores (2011) não observaram indução na expressão de RNAm da CYP3A4 em células HepG2 após o tratamento com baixas concentrações ($< 22 \mu\text{g/mL}$) de uma preparação de *Echinacea* e de alcaloides isolados desta planta. Contudo, Awortwe e colaboradores (2015) confirmaram que a *Echinacea purpurea* aumentou significativamente a expressão de CYP3A4 em células HepG2 transfectadas com PXR, indicando que a indução ocorre e o mecanismo provável é via modulação de PXR. Um estudo realizado *in vivo* com *Echinacea purpurea* demonstrou que o extrato dessa planta aumentou a depuração do midazolam, substrato da CYP3A4, pela via hepática, sugerindo a atividade desse extrato também no metabolismo exercido pela CYP3A4 (GORSKI et al., 2004). Algumas espécies de *Echinacea* contêm ácido cafeico, composto que possui estrutura muito semelhante à do ácido clorogênico, previamente citado como um indutor da expressão da CYP3A4. Assim, o ácido cafeico presente no extrato EQ poderia estar atuando como indutor da expressão da CYP3A4 observada neste trabalho (LI et al., 2010; MANAYI; VAZIRIAN; SAEIDNIA, 2015).

O ácido clorogênico também é encontrado em outras plantas como a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e o chá-verde (*Camellia sinensis*), das quais os extratos não induziram a expressão de CYP3A4 neste trabalho. Neste caso, se enfatiza a importância de ser considerada a complexidade dos extratos, como já argumentado no Capítulo III (HELLUM; NILSEN, 2007).

Um estudo com espécies de *Bauhinia* sp. identificou 90 metabólitos secundários presentes nesta planta (FARAG et al., 2015). Os seus compostos majoritários são flavonoides O-glicosídicos, sendo os mais abundantes a quercetina e o canferol (FARIAS; MENDEZ, 2014). Como citado anteriormente, a indução da expressão da CYP3A4 pela quercetina já foi descrita, tendo sido, inclusive, sugerida que a indução ocorreu via VDR em células Caco-2. Indução da expressão da CYP3A4 também foi observada utilizando canferol (CHAE et al., 2016; DROCOURT et al., 2002). Sendo assim, esses flavonoides podem ser os responsáveis pela indução da expressão da CYP3A4, observada no sistema CYP3A4 ZsGreen1-1 com o tratamento com o extrato BF.

Não foi observada uma modulação significativa ($p < 0,05$) da expressão da CYP3A4 no sistema CYP3A4 ZsGreen1-1 pelos extratos CSc, CSi, CR, IP, GB e GM.

Na literatura, já foi relatada uma fraca inibição da expressão da CYP3A4 em hepatócitos por um extrato de *Cynara scolymus*, embora o mesmo não tenha ocorrido com células Caco-2 (LÖHR; DETERS; HENSEL, 2009).

O extrato de *Cimicifuga racemosa* em ratos também não ativou hPXR, um importante receptor modulador da expressão da CYP3A4 (PANG et al., 2011).

Embora um estudo com células HepG2 e o extrato de *Ginkgo biloba* tenha demonstrado indução de PXR e da expressão de RNAm da CYP3A4 *in vitro* (LAU et al., 2010), em um estudo clínico não foi detectada modificação na farmacocinética do midazolam, substrato da CYP3A4, em indivíduos tratados com esse extrato (GURLEY et al., 2005).

Assim, de modo geral, os resultados obtidos utilizando o sistema repórter CYP3A4 ZsGreen1-1 concordam com os descritos na literatura.

Resultados divergentes dos obtidos com o sistema CYP3A4 ZsGreen1-1 com células diferenciadas foram encontrados em estudos com ratos, no qual a expressão da CYP3A1, análoga da CYP3A4 humana, teve expressão reduzida pelo extrato da *Camellia sinensis* (BOGACZ et al., 2013), bem como pelo extrato de *Glycine max* em intestino e fígado de ratos, porém sem a modulação de PXR, RXR e HNF-4 α (BOGACZ et al., 2014). Resultados similares foram detectados em outro estudo com ratos

após o tratamento com extrato de soja por três e dez dias (MROZIKIEWICZ et al., 2010).

Apesar disso, utilizando macacos e células hepáticas, não foi verificada diferença significativa na expressão de RNAm da CYP3A4 após o tratamento com isoflavonas derivadas da soja (SCOTT et al., 2008). Do mesmo modo, Li e colaboradores (2009) descreveram que as isoflavonas genisteína, daidzeína e equol não afetaram significativamente a expressão do RNAm da CYP3A em hepatócitos primários. Entretanto, quando as isoflavonas genisteína e daidzeína foram testadas em hepatócitos primários de ratos, ocorreu indução da expressão do RNAm, mas sem efeitos observados para o equol. Sendo assim, a modulação da expressão da CYP3A4 parece ser espécie-específica e tecido-específica, o que justificaria as divergências e não tornaria conveniente a comparação dos resultados obtidos em células de origem humana com as de animais neste caso (MARTIGNONI; GROOTHUIS; KANTER, 2006).

Para o extrato de *Ilex paraguariensis*, não foram encontrados, até o momento, dados na literatura sobre estudos de modulação da expressão da CYP3A4.

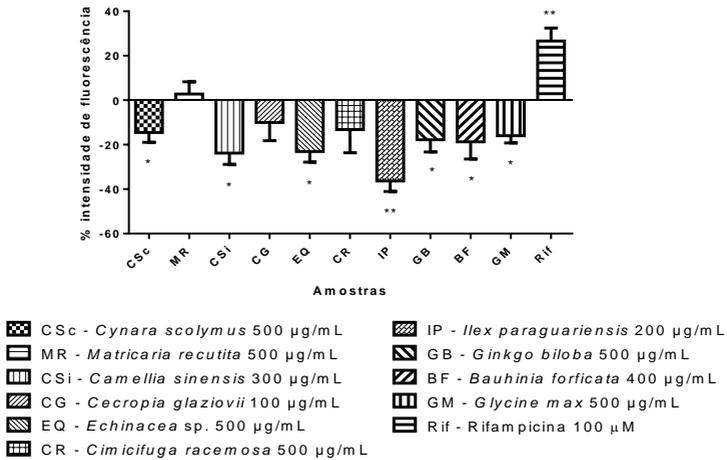
Resumidamente, a diferenciação das células Caco-2 alterou a resposta do sistema repórter CYP3A4 ZsGreen1-1 ao tratamento com xenobióticos. A diferenciação celular parece sensibilizar as células à indução da expressão da enzima metabólica, embora a intensidade de fluorescência basal expressa pelas células diferenciadas e não diferenciadas não apresente diferença estatística (Figura V. 6). Aparentemente, devido à similaridade na resposta obtida com o sistema utilizando células diferenciadas em comparação aos demais estudos da literatura, pode-se verificar que a diferenciação celular é necessária para a adequada avaliação da expressão da CYP3A4 em células Caco-2. Além disso, vários extratos testados modularam a expressão dessa enzima *in vitro*, sugerindo a possível ocorrência de interações *in vivo*.

3.5.2 Sistema repórter CYP2D6 ZsGreen1-1

Ao contrário do verificado para o sistema CYP3A4 ZsGreen1-1, a maioria dos extratos testados nos sistemas repórteres CYP2D6 ZsGreen1-1, manteve inibição da expressão da fluorescência também observada em células não diferenciadas.

Os extratos CSc ($p < 0,05$); CSi ($p < 0,05$); EQ ($p < 0,05$); IP ($p < 0,01$); GB ($p < 0,05$); BF ($p < 0,05$) e GM ($p < 0,05$) inibiram significativamente a expressão da fluorescência, enquanto o controle positivo (rifampicina) induziu a expressão da GFP ($p > 0,01$), conforme observado na Figura V. 13.

Figura V. 13 - Modulação da expressão da fluorescência após 48 h de tratamento das células diferenciadas do sistema CYP2D6 ZsGreen1-1.



Dados apresentados em % de intensidade de fluorescência \pm desvio padrão. Os dados foram normalizados pelo controle celular não tratado (CYP2D6 ZsGreen1-1). A figura representa análises de três experimentos independentes, os quais foram avaliados por teste t de Student, com intervalo de confiança de 95%, comparando cada tratamento com o controle celular. Foi observada inibição significativa da expressão da fluorescência para os extratos CSc * ($p < 0,05$); CSi * ($p < 0,05$); EQ * ($p < 0,05$); IP ** ($p < 0,01$); GB * ($p < 0,05$); BF * ($p < 0,05$) e GM * ($p < 0,05$). Indução significativa da expressão da fluorescência foi verificada com o tratamento com rifampicina * ($p < 0,05$).

Na literatura é descrita a infrequente indução da expressão da CYP2D6 por xenobióticos, conforme discutido anteriormente (FAROOQ et al., 2016; HE et al., 2015; HELLMUM; NILSEN, 2007). Assim, a modulação predominantemente negativa da expressão gênica concorda com as características de expressão apresentadas por essa enzima.

Alguns estudos avaliaram a ação de produtos naturais sobre a atividade da CYP2D6, porém investigações sobre a modulação da expressão gênica da CYP2D6 com esses produtos são bastante limitadas (BOGACZ et al., 2014; MROZIKIEWICZ et al., 2010; SU et al., 2012).

Não foram encontrados nas bases de dados consultadas, até o momento, trabalhos sobre expressão gênica da CYP2D6 humana associada ao uso das plantas medicinais selecionadas para este estudo. Assim, esse é o primeiro trabalho que relata a modulação da expressão da CYP2D6 por tais extratos.

Alguns pontos sobre a modulação da expressão da CYP2D6 estão discutidos no Capítulo VI, no qual são apresentados os resultados da avaliação da expressão gênica da CYP2D6 por RT-qPCR. Informações sobre a regulação da atividade da CYP2D6 e possíveis interações já foram discutidas no Capítulo IV deste trabalho.

3.6 Comparação do efeito dos extratos na expressão gênica das enzimas metabólicas utilizando os sistemas repórteres com células não diferenciadas e diferenciadas

Embora não tenham sido utilizados os mesmos tempos de tratamento, a comparação dos resultados obtidos com células diferenciadas e não diferenciadas podem trazer informações interessantes acerca do efeito dos extratos sobre a expressão das enzimas avaliadas. Sendo assim, essa comparação foi efetuada. Um resumo dos resultados pode ser visto na Tabela V. 1.

Dos extratos testados, três deles (CSc, CSi e GB) não apresentaram modulação da expressão da CYP3A4 tanto em células diferenciadas como não diferenciadas; três outros (CR, IP e GM) inibiram a expressão em células não diferenciadas, efeito esse que desapareceu após a diferenciação celular; três deles (MR, EQ e BF) apresentaram efeitos opostos, de acordo com a diferenciação celular, e um extrato (CG) induziu a expressão da CYP3A4 em células diferenciadas, não tendo efeito em células não diferenciadas.

Tabela V. 1 - Resumo dos efeitos dos tratamentos em células dos sistemas repórteres não diferenciadas e diferenciadas.

		CSc	MR	CSi	CG	EQ	CR	IP	GB	BF	GM	Rif	Tempo de tratamento
CYP3A4	Conc. µg/mL	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	82,3*	
	Não diferenciadas	-	↓	-	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↑	24 h
	Diferenciadas	-	↑	-	↑	↑	-	-	-	↑	-	↑	48 h
	Conc. µg/mL	500	500	300	100	500	500	200	500	400	500	82,3*	
CYP2D6	Conc. µg/mL	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	82,3*	
	Não diferenciadas	-	-	↓	-	↓	↓	↓	-	-	-	↑	24 h
	Diferenciadas	↓	-	↓	-	↓	-	↓	↓	↓	↓	↑	48 h
	Conc. µg/mL	500	500	300	100	500	500	200	500	400	500	82,3*	

Legenda: (↑) Indução; (↓) Inibição; (-) Sem modulação detectada; * Rifampicina 100 µM.

Dos extratos testados, dois deles (MR e CG) não tiveram efeito sobre a expressão da CYP2D6 tanto em células diferenciadas como não diferenciadas; um extrato (CR) reduziu a expressão em células não diferenciadas, efeito que desapareceu após a diferenciação celular; quatro extratos (CSc, GB, BF e GM) reduziram a expressão em células diferenciadas, mas não em células não diferenciadas; e três extratos (CSi, EQ e IP) inibiram a expressão da CYP2D6 tanto em células diferenciadas como não diferenciadas.

A única semelhança na atividade dos extratos sobre a expressão gênica de ambas as enzimas se deu com os extratos EQ, CR, IP em células não diferenciadas. A possível atuação em alguma via de indução de expressão comum entre as enzimas pode ser sugerida.

O fármaco rifampicina induziu a expressão gênica de ambas as enzimas, tanto em células diferenciadas como não diferenciadas, o que indica que o mecanismo de indução por esse fármaco é independente da diferenciação das células.

Os extratos que não apresentaram modulação, tanto em células não diferenciadas como diferenciadas, sugestivamente não devem modular a expressão gênica dessas enzimas *in vivo*.

Os extratos que apresentaram o mesmo tipo de modulação, tanto em células diferenciadas como não diferenciadas, sugestivamente indicam que a modulação efetuada pelos extratos não sofre influência de proteínas de efluxo ou de proteínas associadas à modulação da expressão gênica das enzimas analisadas e que alteram os níveis de expressão ou de atividade, em função da diferenciação celular (KUBLBECK et al., 2016).

Os extratos que apresentaram efeitos opostos nas células não diferenciadas e diferenciadas, podem sofrer interferência da modificação da expressão das proteínas de influxo e efluxo, de proteínas reguladoras da expressão e da “maturidade” dos processos de sinalização celular, de acordo com o nível de diferenciação celular (LANDOWSKI et al., 2004).

A ocorrência de modulação em células diferenciadas e não em células não diferenciadas também pode estar associada à alteração na expressão/atividade das proteínas nas células Caco-2 durante a diferenciação (LANDOWSKI et al., 2004). Sabe-se, por exemplo, que o nível de expressão da P-gp é muito maior em células Caco-2 não diferenciadas do que em células diferenciadas

(GOTO et al., 2003). No entanto, a expressão de BCRP, MRP2 e de transportadores de influxo, como os OATP2B1, é maior em células diferenciadas do que em células Caco-2 não diferenciadas (KUBLBECK et al., 2016). De tal forma, alterações no efluxo de compostos moduladores podem modificar os efeitos nas células, conforme o nível de diferenciação. A presença do efeito também pode ocorrer por atuação de algum metabólito do extrato nas células tratadas por 48 h.

Quando o contrário é observado, ou seja, a ocorrência de efeito em células não diferenciadas, que posteriormente desaparece nas células diferenciadas, alteração na expressão dos transportadores de efluxo e influxo também podem ser responsáveis por esse resultado. Neste estudo em específico, pode ter ocorrido a perda da atividade dos moduladores por inativação dos compostos por biotransformação, não apenas pela modificação no tempo de incubação, mas principalmente por uma possível alteração da expressão de enzimas metabólicas diversas (KUBLBECK et al., 2016).

4. CONCLUSÃO

Os sistemas desenvolvidos neste trabalho podem ser úteis na elucidação dos mecanismos de interações entre plantas medicinais e fármacos e, também, para análise da modulação da expressão gênica das enzimas durante a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

A prévia avaliação de parâmetros farmacocinéticos e de potenciais interações de novos candidatos a fármacos é de suma importância, pois 40 a 60% dos mesmos não avançam nas pesquisas de fases clínicas devido a problemas com suas características farmacocinéticas (CASCONI et al., 2016; FDA, 2012).

Tendo em vista que os sistemas desenvolvidos são de fácil utilização após o seu estabelecimento, não necessitam de marcação celular com anticorpos, o que geraria maiores custos, e considerando que a técnica de citometria de fluxo é relativamente acessível, estes modelos podem ser úteis para as aplicações citadas.

Os resultados apresentados revelam a importância do uso de células Caco-2 diferenciadas para os estudos farmacocinéticos. Adicionalmente, os dados obtidos com os sistemas repórteres

indicaram que os extratos das plantas medicinais testadas podem modular a expressão gênica das enzimas CYP3A4 e da CYP2D6 *in vitro*, sugerindo que o mesmo pode ocorrer *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AL-DOSARI, M. et al. Direct assessment of promoter activity of human cytochrome P450 genes using optimized transfection *in vitro* and *in vivo*. **Biosci Rep**, v. 26, n. 3, p. 217-29, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16850252> >.

ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clin Liver Dis**, v. 21, n. 1, p. 20, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27842765> >.

AWORTWE, C.; FASINU, P. S.; ROSENKRANZ, B. Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges. **J Pharm Pharm Sci**, v. 17, n. 1, p. 19, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735758> >.

AWORTWE, C. et al. *Echinacea purpurea* up-regulates CYP1A2, CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of pregnane X receptor pathway. **Xenobiotica**, v. 45, n. 3, p. 218-29, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25377539> >.

BADOLO, L. et al. Evaluation of 309 molecules as inducers of CYP3A4, CYP2B6, CYP1A2, OATP1B1, OCT1, MDR1, MRP2, MRP3 and BCRP in cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture. **Xenobiotica**, v. 45, n. 2, p. 177-87, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183402> >.

BOGACZ, A. et al. The influence of soybean extract on the expression level of selected drug transporters, transcription factors and cytochrome P450 genes encoding phase I drug-metabolizing enzymes. **Ginekol Pol**, v. 85, n. 5, p. 348-53, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25011215> >.

BOGACZ, A. et al. Effect of *Camellia sinensis* extract on the expression level of transcription factors and cytochrome P450 genes coding phase I drug-metabolizing enzymes. **Herba Polonica**, v. 59, n. 4, p. 15, 2013. Disponível em: < [http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/7181806-Bogacz%20et%20al%20\(1\).pdf](http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/7181806-Bogacz%20et%20al%20(1).pdf) >.

BOGACZ, A. et al. The influence of a standardized soybean extract (*Glycine max*) on the expression level of CYP3A enzymes and pregnane X receptor in *in vivo* model. **Ginekol Pol**, v. 81, n. 11, p. 814-20, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21365896> >.

CAIRNS, W. et al. Characterization of the human cytochrome P4502D6 promoter. A potential role for antagonistic interactions between members of the nuclear receptor family. **J Biol Chem**, v. 271, n. 41, p. 25269-76, 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810289> >.

CASCONE, S. et al. Gastrointestinal behavior and ADME phenomena: I. *In vitro* simulation **J Drug Deliv Sci Technol**, v. 35, p. 12, 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224716302659> >.

CHAE, Y. J. et al. Vitamin D Receptor-Mediated Upregulation of CYP3A4 and MDR1 by Quercetin in Caco-2 cells. **Planta Med**, v. 82, n. 1-2, p. 121-30, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26366751> >.

CHARITÉ. **SuperCYP**. Germany: Structural Bioinformatics Group - Institute of Molecular Biology and Bioinformatics, 2017. Disponível em: < <http://bioinformatics.charite.de/supercyp/> >.

CHUDAKOV, D. M. et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. **Physiol Rev**, v. 90, n. 3, p. 1103-63, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664080> >.

COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Nat Prod**

Commun, v. 6, n. 6, p. 913-20, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21815438> >.

DROCOURT, L. et al. Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 28, p. 25125-32, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991950> >.

FAHMI, O. A.; RIPP, S. L. Evaluation of models for predicting drug-drug interactions due to induction. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 6, n. 11, p. 1399-416, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20955108> >.

FARAG, M. A. et al. Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC-PDA-qTOF-MS and chemometrics. **Phytochemistry**, v. 119, p. 41-50, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26410474> >.

FARIAS, L. D. S.; MENDEZ, A. S. L. LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. *pruinosa*. **Quim Nova**, v. 37, n. 3, p. 483-6, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422014000300016 >.

FARKAS, A. E. et al. HNF4alpha regulates claudin-7 protein expression during intestinal epithelial differentiation. **Am J Pathol**, v. 185, n. 8, p. 2206-18, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26216285> >.

FAROOQ, M.; KELLY, E. J.; UNADKAT, J. D. CYP2D6 Is Inducible by Endogenous and Exogenous Corticosteroids. **Drug Metab Dispos**, v. 44, n. 5, p. 750-7, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26965986> >.

FDA (Food and Drug Administration). **Guidance for Industry Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations**. U.S. Department of Health and Human Services. United States: Food and Drug Administration, 2012. 79 p.

FERRUZZA, S. et al. A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 8, p. 1252-5, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22265977> >.

FROMM, M. F.; KIM, R. B. **Drug Transporters**. Springer, 2011. 457 p.

GANZERA, M.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. **Life Sci**, v. 78, n. 8, p. 856-61, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16137701> >.

GOODWIN, B.; HODGSON, E.; LIDDLE, C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 6, p. 1329-39, 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570062> >.

GORSKI, J. C. et al. The effect of echinacea (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity *in vivo*. **Clin Pharmacol Ther**, v. 75, n. 1, p. 89-100, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749695> >.

GOTO, M. et al. Decreased expression of P-glycoprotein during differentiation in the human intestinal cell line Caco-2. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n. 1, p. 163-70, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818377> >.

GRIMM, S. The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 3, p. 179-89, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14970820> >.

GURLEY, B. J. et al. Clinical assessment of effects of botanical supplementation on cytochrome P450 phenotypes in the elderly: St John's wort, garlic oil, *Panax ginseng* and *Ginkgo biloba*. **Drugs Aging**, v. 22, n. 6, p. 525-39, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15974642> >.

GURLEY, B. J. et al. Clinical assessment of CYP2D6-mediated herb-drug interactions in humans: effects of milk thistle, black cohosh, goldenseal, kava kava, St. John's wort, and Echinacea. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. 7, p. 755-63, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18214849> >.

HASHIMOTO, H. et al. Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. **Eur J Biochem**, v. 218, n. 2, p. 585-95, 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8269949> >.

HE, Z. X. et al. Impact of physiological, pathological and environmental factors on the expression and activity of human cytochrome P450 2D6 and implications in precision medicine. **Drug Metab Rev**, v. 47, n. 4, p. 470-519, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574146> >.

HELLUM, B. H.; NILSEN, O. G. The *in vitro* inhibitory potential of trade herbal products on human CYP2D6-mediated metabolism and the influence of ethanol. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 101, n. 5, p. 350-8, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17910620> >.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nat Protoc**, v. 2, n. 9, p. 2111-9, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853866> >.

KAMIYAMA, Y. et al. Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 22, n. 4, p. 287-98, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827783> >.

KUBLBECK, J. et al. Genetically Modified Caco-2 Cells With Improved Cytochrome P450 Metabolic Capacity. **J Pharm Sci**, v. 105, n. 2, p. 941-49, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26869438> >.

LANDOWSKI, C. P. et al. Transporter and ion channel gene expression after Caco-2 cell differentiation using 2 different microarray technologies. **AAPS J**, v. 6, n. 3, p. 21, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760106> >.

LAU, A. J. et al. Human pregnane X receptor agonism by *Ginkgo biloba* extract: assessment of the role of individual ginkgolides. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 335, n. 3, p. 771-80, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739453> >.

LI, A. P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 6, n. 7, p. 357-66, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11267922> >.

LI, T.; CHIANG, J. Y. Rifampicin induction of CYP3A4 requires pregnane X receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4alpha and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression. **Drug Metab Dispos**, v. 34, n. 5, p. 756-64, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455805> >.

LI, Y. et al. Human CYP3A4 and murine Cyp3A11 are regulated by equol and genistein via the pregnane X receptor in a species-specific manner. **J Nutr**, v. 139, n. 5, p. 898-904, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19297428> >.

LI, Y. et al. Induction of CYP3A4 and MDR1 gene expression by baicalin, baicalein, chlorogenic acid, and ginsenoside Rf through constitutive androstane receptor- and pregnane X receptor-mediated pathways. **Eur J Pharmacol**, v. 640, n. 1-3, p. 46-54, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580705> >.

LÖHR, G.; DETERS, A.; HENSEL, A. *In vitro* investigations of *Cynara scolymus* L. extract on cell physiology of HepG2 liver cells. **Braz J Pharm Sci**, v. 45, n. 2, p. 8, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502009000200003 >.

MANAYI, A.; VAZIRIAN, M.; SAEIDNIA, S. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. **Pharmacogn Rev**, v. 9, n. 17, p. 63-72, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26009695> >.

MARCIL, V. et al. Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4alpha knockdown in intestinal epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 52, p. 40448-60, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20871093> >.

MARQUEZ, B.; VAN BAMBEKE, F. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 600-20, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039335> >.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M.; KANTER, R. D. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 2, n. 6, p. 875-94, 2006. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.2.6.875?sroll=top&needAccess=true> >.

MISAKA, S. et al. Effects of Green Tea Catechins on Cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A Activities in Human Liver and Intestinal Microsomes. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 28, n. 3, p. 244-49, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268924> >.

MODARAI, M. et al. Safety of Herbal Medicinal Products: Echinacea and Selected Alkylamides Do Not Induce CYP3A4 mRNA Expression. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 7, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906827> >.

MROZIKIEWICZ, P. M. et al. The effect of standardized *Echinacea purpurea* extract on rat cytochrome P450 expression level. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 830-3, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374973> >.

NATOLI, M. et al. Good Caco-2 cell culture practices. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 8, p. 1243-6, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22465559> >.

PAN, X.; NING, M.; JEONG, H. Transcriptional Regulation of CYP2D6 Expression. **Drug Metab Dispos**, v. 45, n. 1, p. 42-48, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27698228> >.

PANG, X. et al. Pregnane X receptor-mediated induction of Cyp3a by black cohosh. **Xenobiotica**, v. 41, n. 2, p. 112-23, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20979450> >.

PARK, H. J. et al. Differences in the Epigenetic Regulation of Cytochrome P450 Genes between Human Embryonic Stem Cell-Derived Hepatocytes and Primary Hepatocytes. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. 17, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26177506> >.

RAMAMOORTHY, A. et al. Regulation of microRNA expression by rifampin in human hepatocytes. **Drug Metab Dispos**, v. 41, n. 10, p. 1763-8, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935064> >.

RAUCY, J. L. Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. **Drug Metab Dispos**, v. 31, n. 5, p. 533-9, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12695340> >.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: CSHL Press, 2001. 2222 p.

SAVAI, J. et al. Investigation of CYP3A4 and CYP2D6 Interactions of *Withania somnifera* and *Centella asiatica* in Human Liver Microsomes. **Phytother Res**, v. 29, n. 5, p. 785-90, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25684704> >.

SCOTT, L. M. et al. Effects of prior oral contraceptive use and soy isoflavonoids on estrogen-metabolizing cytochrome P450

enzymes. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 112, n. 4-5, p. 179-85, 2008. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955142> >.

SEVIOR, D. K. et al. Rapid screening of commercially available herbal products for the inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes using the N-in-one cocktail. **Xenobiotica**, v. 40, n. 4, p. 245-54, 2010. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20218935> >.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 681 p.

SMITH, R. P. et al. Genome-wide discovery of drug-dependent human liver regulatory elements. **PLoS Genet**, v. 10, n. 10, p. 11, 2014. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275310> >.

SU, Z. et al. *In silico* and *in vivo* evaluation of flavonoid extracts on CYP2D6-mediated herb-drug interaction. **J Mol Model**, v. 18, n. 2012, p. 4657-63, 2012. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22648787> >.

TIRONA, R. G. et al. The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. **Nat Med**, v. 9, n. 2, p. 220-4, 2003. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514743> >.

WANG, Y. M. et al. Piperine activates human pregnane X receptor to induce the expression of cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 272, n. 1, p. 96-107, 2013. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707768> >.

YU, C. P. et al. Quercetin and rutin reduced the bioavailability of cyclosporine from Neoral, an immunosuppressant, through activating P-glycoprotein and CYP 3A4. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 9, p. 4644-8, 2011. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466223> >

CAPÍTULO VI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS
CYP3A4 E CYP2D6 E DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA
DOS TRANSPORTADORES P-gp E BCRP**

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste Capítulo são apresentados os dados de modulação da expressão gênica e proteica de enzimas e proteínas de efluxo em células Caco-2 após o tratamento com os extratos das plantas medicinais em estudo. A modulação da expressão gênica foi avaliada por RT-qPCR, por meio da quantificação relativa dos transcritos codificadores das proteínas P-gp, BCRP, CYP3A4 e CYP2D6. A modulação da expressão proteica foi investigada por quantificação das proteínas em células Caco-2 após marcação com anticorpos específicos para as proteínas P-gp e BCRP.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram utilizados os extratos secos das plantas medicinais *Cynara scolymus*; *Matricaria recutita*; *Camellia sinensis*; *Cecropia glaziovii*; *Echinacea* sp.; *Cimicifuga racemosa*; *Ilex paraguariensis*; *Ginkgo biloba*; *Bauhinia forficata* e *Glycine max* para este estudo. Dados específicos sobre os extratos, bem como seus fornecedores estão descritos no Capítulo II.

2.2 Ensaios de modulação da expressão gênica e proteica

As células Caco-2, foram cultivadas e mantidas nas mesmas condições descritas no Capítulo III. As células foram semeadas em placas de 12 cavidades ($2,5 \times 10^5$ células/cavidade), e pré-incubadas nas condições padrão durante 21 a 25 dias. Após a pré-incubação, as células foram tratadas com os extratos das plantas medicinais, utilizando-se concentrações não citotóxicas descritas no Capítulo V, Quadro V.3. Os extratos foram diluídos em DMEM contendo 4,5 g/L de glicose e suplementado com 1% de PS (10.000 U de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina) e filtrados em membrana de 0,22 µM anteriormente à sua aplicação nas células. As células foram incubadas com as amostras por 24 h para posterior marcação com anticorpos anti-P-gp e anti-BCRP, e por 48 h para a extração do material genético utilizado nas análises por RT-qPCR. Quando incubadas por 48 h, o tratamento foi substituído por amostras frescas no tempo de 24 h.

As monocamadas celulares utilizadas para a análise de expressão gênica foram dissociadas utilizando PBS gelado e centrifugadas a $1.150 \times g$ por 10 min. Os sobrenadantes foram aspirados e os precipitados armazenados a -80°C até o momento da extração.

As amostras utilizadas para a análise de expressão proteica foram diretamente submetidas ao processo de marcação com os anticorpos (Item 2.7).

2.3 Desenho dos iniciadores e sondas de hidrólise para as análises de expressão gênica

Com base no banco de dados GenBank foram desenhados iniciadores e sondas de hidrólise específicos para as sequências dos transcritos das proteínas P-gp, BCRP, CYP3A4 e CYP2D6, utilizando os programas PrimerSelect, Versão 7.0.0, BioEdit Sequence Alignment Editor, Versão 7.1.3.0, e FastPCR Professional. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio da Professora Patrícia Hermes Stoco (Laboratório de Protozoologia, MIP, CCB, UFSC). Informações sobre os iniciadores e sondas podem ser vistos no Quadro VI. 1.

O desenho dos iniciadores e das sondas de hidrólise priorizou a obtenção de sequências que não anelassem em DNA genômico. Além disso, para desfavorecer a amplificação de DNA genômico, foi utilizado um kit de extração seletivo para RNA e um kit de RT-qPCR contendo DNase na sua composição.

Quadro VI. 1 - Iniciadores e sondas de hidrólise desenhados para os estudos de expressão dos genes *ABCB1*, *ABCG2*, *CYP3A4* e *CYP2D6* por RT-qPCR.

Sequência de RNAm - gene <i>CYP3A4</i> (NM_017460.5) – Total 119 pb			
	T_m** calculada	Tamanho	%CG
Iniciador senso 5'-CTATGATACTGTGCTACAG-3'	54°C	19 pb	42,1%
Iniciador antisenso 5'-TCCCATTGATCTCAACATC-3'	54°C	19 pb	42,1%
Sonda* 5'-TGACATGGTGGTGAATGAAACG-3'	64°C	22 pb	45%
Sequência de RNAm - gene <i>CYP2D6</i> (NM_000106.5) – Total 101 pb			
	T_m** calculada	Tamanho	%CG
Iniciador senso 5'-CCTAAGGGAACGACACTC-3'	56°C	18 pb	55,6%
Iniciador antisenso 5'-GCATCCAGGAAGTGTTCG-3'	56°C	18 pb	55,6%
Sonda* 5'-AACCTGTCATCGGTGCTGAAG-3'	64°C	21 pb	52,4%
Sequência de RNAm - gene <i>ABCB1</i> (NM_000927.4) – Total 100 pb			
	T_m** calculada	Tamanho	%CG
Iniciador senso 5'-GACTTACAGATGATGTCTC-3'	54°C	19 pb	42,1%
Iniciador antisenso 5'-CCTACTATAAACCCAGTGA-3'	54°C	19 pb	42,1%
Sonda* 5'-TGTTCTTTCAGTCAATGGCAAC-3'	62°C	22 pb	40,9%
Sequência de RNAm - gene <i>ABCG2</i> (NM_004827.2) – Total 128 pb			
	T_m** calculada	Tamanho	%CG
Iniciador senso 5'-GCTCAGATCATTGTCACAG-3'	56°C	19 pb	47,4%
Iniciador antisenso 5'-AAACACTGGTTGGTCGTCA-3'	56°C	19 pb	47,4%
Sonda* 5'-ACTGGGACTGGTTATAGGTGC-3'	64°C	21 pb	52,4%

* Sondas de hidrólise FAM-MGB (Invitrogen).

** T_m calculada de acordo com a regra de Wallace.

2.4 Extração do material genético

As células tratadas com os diferentes extratos foram lavadas e dissociadas utilizando PBS gelado. Posteriormente, as células foram centrifugadas a $1.150 \times g$ por 10 min, os sobrenadantes removidos e os sedimentos utilizados para a extração do RNA com o kit RNeasy® mini kit (Quiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Os materiais extraídos foram avaliados utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Science) para a quantificação do RNA e a determinação da pureza dos produtos extraídos. Uma mistura dos materiais extraídos das células utilizadas nos ensaios foi preparada para a determinação da eficiência de amplificação e implementação do método por RT-qPCR.

2.5 Otimização das reações por PCR convencional

Nesta etapa, foi testada a adequada amplificação dos produtos de interesse por PCR convencional, anteriormente às quantificações por RT-qPCR. A RT foi efetuada com aproximadamente 3.000 ng de material extraído utilizando a enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT), iniciadores randômicos e rNasin® (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A amplificação dos produtos por PCR convencional empregou 1 U da enzima GoTaq® Flexi DNA polymerase em tampão GoTaq Flexi Buffer 5 x (Promega), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP e de 1 μL de DNAc em reações com volume de 25 μL . A concentração dos iniciadores testadas variou de 1,5-0,2 μM e como controle negativo foram preparadas reações sem adição de DNAc.

As ciclagens ocorreram em termociclador Techne (Flexigene) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min; hibridização em diferentes temperaturas até adequação da reação por 30 s; extensão a 72°C por 30 s e extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%, corados com brometo de etídio, e analisados no fotodocumentador DigiDoc-It™ associado ao programa Doc-ItLS, Versão 6.8.2 (Life Science).

2.6 RT-qPCR

Após a otimização das reações por PCR convencional foi avaliada a eficiência de amplificação da RT-qPCR para os diferentes alvos. Diluições seriadas (1:2 v/v) do DNAc foram preparadas em água DEPC (dicarbonato de etila) a partir de 1.000 ng de DNAc, com, ao menos, cinco concentrações para cada curva. As condições de reação e as temperaturas de anelamento (T_a °C) estão descritas no Quadro VI. 2. Para a avaliação da eficiência e quantificação das amostras foi utilizado o kit QuantiNova Probe PCR (Quiagen).

Quadro VI. 2 - Condições utilizadas nas reações de RT-qPCR.

	Temperatura de anelamento	Concentração dos iniciadores	Concentração das sondas de hidrólise	Volume de reação
P-gp	55°C	0,4 µM	0,4 µM	10 µL
BCRP	55°C	0,2 µM	0,4 µM	10 µL
CYP3A4	55°C	0,4 µM	0,4 µM	10 µL
CYP2D6	54°C	0,2 µM	0,4 µM	10 µL
ACTB	60°C	0,9 µM	0,25 µM	10 µL
GAPDH	60°C	0,9 µM	0,25 µM	10 µL

β -actina (ACTB); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Para a determinação da eficiência de amplificação, as ciclagens foram executadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s; hibridização na T_a °C específica para cada alvo por 30 s (Quadro VI. 2) e extensão a 60°C por 30 s. Para a amplificação, foi usado o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) e placas MicroAmp® Optical 96-Well de 0,1 mL recobertas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems®). Os resultados obtidos foram analisados com o programa StepOne™, Versão 2.1.

Para a quantificação dos transcritos, as mesmas condições de reação descritas acima foram utilizadas. Porém, foi adicionada uma incubação inicial a 45°C por 10 min para a transcrição reversa, visto que o kit possui uma transcriptase reversa e as reações podem ser efetuadas sequencialmente nestas análises utilizando RNA como molde. Todas as reações foram executadas com total de 100 ng de RNA por reação. Para

obtenção de uma quantidade suficiente de RNA para a extração foram efetuados experimentos independentes e as suspensões celulares de cada tratamento específico foram agrupadas. Foram obtidos quatro grupos para cada tratamento, os quais tiveram seus RNAs extraídos e quantificados por RT-qPCR. Como controle negativo de reação foram preparadas reações sem adição de RNA molde.

Os dados de quantificação das amostras foram normalizados pela quantificação dos transcritos dos genes de referência constitutivos codificadores da *beta-actina* (ACTB) e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Para a análise dos transcritos de referência foram empregadas preparações comerciais de iniciadores e sondas de hidrólise (Hs01060665 g1 – ACTB e Hs02758991g1 – GAPDH, Applied Biosystems). Foi aplicado 1 µL da preparação por reação de 10 µL e as condições de ciclagem seguiram o descrito anteriormente no item 2.

A quantificação relativa $\Delta\Delta C_q$ foi calculada pela Equação 1 e a variação da expressão em % calculada pela Equação 2. Para o cálculo do C_q ref foi efetuada a média geométrica dos genes de referências adotados.

Equação 1.
$$\Delta\Delta C_q = 2^{-(C_q \text{ al.} - C_q \text{ ref.}) - (C_q \text{ cont.} - C_q \text{ ref.})}$$

C_q al. = Ciclo de quantificação do alvo

C_q ref. = Ciclo de quantificação dos genes de referência

C_q cont. = Ciclo de quantificação do controle experimental

Equação 2.
$$\% = (\Delta\Delta C_q + 1) \times 100$$

$\Delta\Delta C_q$ = Quantificação relativa

2.7 Marcação das células Caco-2 com os anticorpos anti-P-gp e anti-BCRP

As células tratadas com os diferentes extratos foram lavadas com PBS e dissociadas utilizando PBS gelado. Após a dissociação, as células foram centrifugadas a 1.150 x g por 5 min e os precipitados fixados por 15 min a -20°C com 500 µL de metanol PA (para marcação da BCRP) ou de paraformaldeído 4%

(para a marcação da P-gp). Após a fixação, as células foram novamente centrifugadas a 1.900 x g por 5 min e os sedimentos permeabilizados com 500 µL de Triton X-100 0,1% por 15 min (para marcação da BCRP) ou 40 min (para a marcação da P-gp) à temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 1.900 x g por 5 min e ressuspensas em PBS gelado, para a adição de 10 µL do anticorpo anti-P-gp (FITC Mouse Anti-Human P-glycoprotein, BD Biosciences) ou 5 µL do anticorpo anti-BCRP (PE Mouse Anti-Human CD338, BD Biosciences). As células foram incubadas em banho de gelo por aproximadamente 1 h e após centrifugadas a 1.900 x g por 5 min. Os sedimentos foram lavados com PBS, as células novamente centrifugadas a 1.900 x g por 5 min e aos sedimentos foi adicionada uma mistura de PBS contendo 5 mM de EDTA. As células foram analisadas por citometria de fluxo, com aquisição de 10.000 eventos, no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (P-gp excitação/emissão 488/515-545 e BCRP excitação/emissão 488/564-606). Os resultados foram analisados com o programa Flowing, Versão 2.5.0. Como controle negativo foram usadas células tratadas, fixadas e permeabilizadas, porém não marcadas com os anticorpos.

O cálculo da intensidade de fluorescência foi efetuado conforme Equação 3, considerando a média geométrica da intensidade de fluorescência obtida para cada amostra.

Equação 3.

$$F (\%) = \left[\frac{(F1 \times 100)}{Fb} - 100 \right] - \left[\frac{(F2 \times 100)}{Fb} - 100 \right]$$

F (%) = Média geométrica da intensidade de fluorescência em %

F1 = Fluorescência mensurada nas células marcadas com anticorpos

F2 = Fluorescência mensurada nas células não marcadas com anticorpos

Fb = Fluorescência basal das células Caco-2

2.8 Análise estatística

Os resultados de expressão foram analisados no programa GraphPad Prism 5 utilizando o teste *t* de Student. Detalhes específicos da estatística serão apresentados juntamente a cada grupo de resultados.

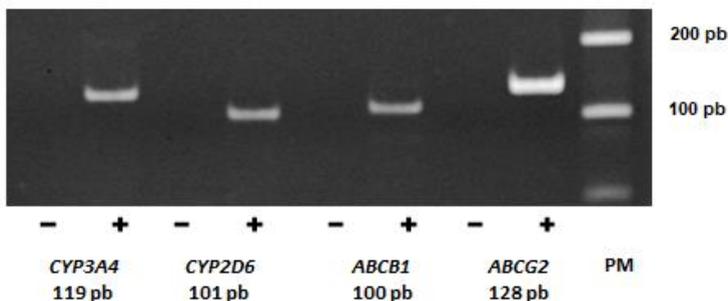
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Amplificação dos produtos de interesse

Anteriormente às quantificações por RT-qPCR, foram testadas a adequada amplificação das sequências de interesse e as condições de reação mais apropriadas para cada par de iniciadores por PCR convencional.

Como pode ser observado na Figura VI. 1, bandas com os tamanhos esperados para cada transcrito (119 pb para *CYP3A4*, 101 pb para *CYP2D6*, 100 pb para *ABCB1* e 128 pb para *ABCG2*) foram visualizadas por eletroforese dos produtos de reação em gel de poliacrilamida 10%. O resultado apresentado foi obtido posteriormente à otimização das Ta°C e das concentrações dos iniciadores, permitindo estabelecer condições iniciais para realizar as curvas de eficiência de amplificação por RT-qPCR.

Figura VI. 1 - Bandas dos produtos obtidos por RT seguida de PCR convencional em gel de poliacrilamida 10%.



As bandas correspondem aos produtos de interesse amplificados a partir dos transcritos alvo. O gel representa as amplificações positivas para cada transcrito analisado (+) acompanhadas de seus respectivos controles negativos (-) em comparação com o padrão de peso molecular de 100 pb (PM).

3.2 Eficiência de amplificação das reações de RT-qPCR

A RT-qPCR é uma metodologia molecular utilizada para a quantificação de RNAm presente em quantidades relativamente baixas nas amostras, de forma sensível, específica e dinâmica (BUSTIN et al., 2009; WALKER; RAPLEY, 2008). O princípio da técnica se baseia na conversão de RNAm em DNAc por ação de uma transcriptase reversa, o qual posteriormente é amplificado utilizando a enzima DNA polimerase. A reação pode ser efetuada em um único tubo e são utilizados marcadores fluorescentes, como sondas de hidrólise ou intercalantes de DNA, para o acompanhamento em tempo real da amplificação do DNA (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006; STAHLBERG et al., 2004). A quantificação do RNAm possibilita fazer uma relação com a expressão gênica da proteína alvo. Diversos trabalhos utilizam a técnica de RT-qPCR para avaliação da expressão gênica das enzimas CYP450 e de transportadores ABC (BADOLO et al., 2015; DROZDZIK et al., 2014; HAN; CHIN TAN; LIM, 2008; MANDA et al., 2016). Deste modo, essa técnica tradicional foi empregada para a execução dessa etapa do trabalho.

A eficiência de amplificação foi verificada utilizando DNAc, o qual foi obtido por RT a partir de uma mistura de RNAs extraídos das diferentes amostras em estudo, tratadas e não tratadas. Todas as amostras foram avaliadas por espectrofotometria e apresentaram valores de A_{260/280} entre 1,973 a 2,064, indicando pureza adequada do material.

As curvas foram construídas por diluição seriada para a determinação da eficiência de amplificação e do coeficiente de determinação (R^2). Os resultados podem ser visualizados na Tabela VI. 1.

A eficiência de amplificação alcançada utilizando os iniciadores desenhados para os alvos em estudo foi de 95-105% e o $R^2 > 0,99$. Para os genes de referência, a eficiência de amplificação foi de 95-105% e o $R^2 > 0,98$. Os resultados obtidos indicam uma adequada eficiência de amplificação para o uso nas reações propostas neste trabalho (NOLAN et al., 2006).

Como as curvas foram avaliadas com DNAc obtido por transcrição reversa com um kit/enzima diferentes dos empregados para a RT da RT-qPCR, algumas curvas não apresentaram amplificação dos produtos no âmbito da variação dos C_q observado para as amostras utilizando o kit para RT-qPCR. Assim,

para garantir que a eficiência de amplificação se mantivesse quando usado RNA como molde, curvas de eficiência de amplificação foram feitas também com RNA para os alvos em que os C_q não abrangeram os C_q apresentados pelas amostras. As curvas iniciaram com 180 ng de RNA considerando ao menos cinco pontos para a curva. Como visto na Tabela VI. 1, a eficiência de amplificação e o R^2 obtido para as reações utilizando RNA como molde ficou entre 92-100% e o $R^2 > 0,98$ e foram considerados satisfatórios.

Tabela VI. 1 - Dados das curvas de amplificação obtidas por RT-qPCR.

Alvo	Slope		E		R ²		Concentração (ng)
	DNAc	RNA	DNAc	RNA	DNAc	RNA	DNAc
CYP3A4	-3,307	-3,444	100,6	95,2	0,996	0,997	500 – 15,62
CYP2D6	-3,443	-	95,2	-	0,992	-	1000 – 31,25
P-gp	-3,370	-3,526	98,0	92,1	0,995	0,992	500 – 31,25
BCRP	-3,318	-3,443	100,7	95,2	0,991	0,985	500 – 31,25
ACTB	-3,441	-	95,3	-	0,993	-	500 – 31,25
GAPDH	-3,446	-	95,1	-	0,987	-	500 – 31,25

N = não foi necessária a repetição com RNA, variação dos C_q adequada.

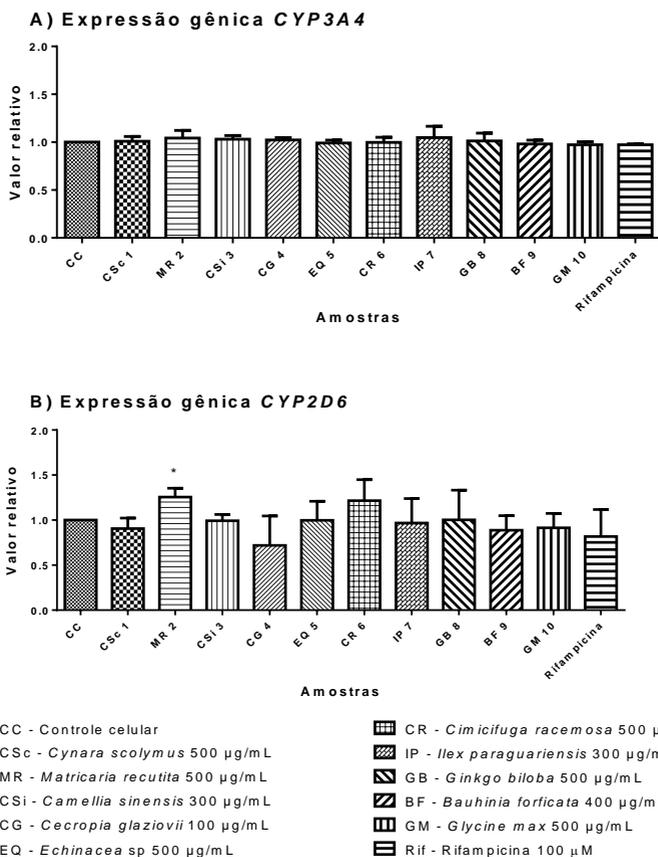
E = Eficiência de amplificação

3.3 Modulação da expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 e dos transportadores P-gp e BCRP em células Caco-2 pelos extratos das plantas medicinais em estudo

A expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 e dos transportadores P-gp e BCRP foram avaliados por RT-qPCR após a exposição das células Caco-2 a duas aplicações sequenciais dos extratos e incubação por 24 h para cada aplicação. Os dados obtidos estão apresentados na Figura VI. 2 e 3.

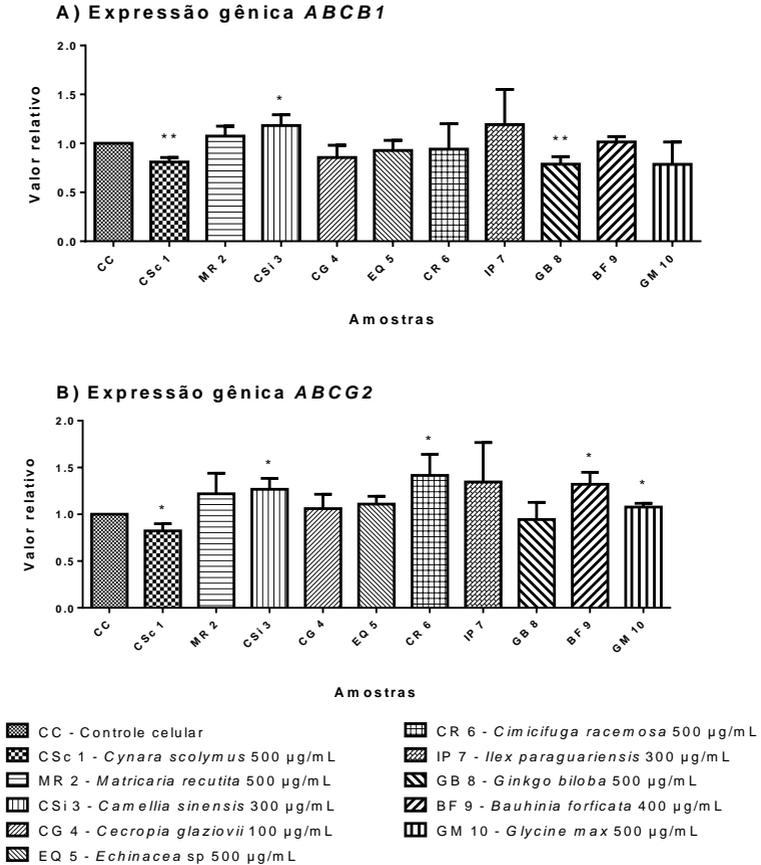
Como pode ser observado, não foram detectadas diferenças significativas na expressão gênica da CYP3A4 em comparação ao controle, após o tratamento das células com os extratos ($p > 0,05$). Diferenças significativas também não foram detectadas para a expressão gênica da CYP2D6 em relação ao controle, exceto para o tratamento com o extrato de *Matricaria recutita*, o qual induziu a expressão gênica da CYP2D6 ($p < 0,05$).

Figura VI. 2 - Expressão dos genes (A) *CYP3A4* e (B) *CYP2D6* em células Caco-2, após o tratamento com os extratos das plantas medicinais em estudo.



Dados apresentados em valor relativo \pm desvio padrão. Os dados foram analisados por teste *t* de Student e correspondem a ao menos três experimentos independentes. Não foi observada diferença estatística na expressão gênica da *CYP3A4* entre o controle celular e as células tratadas com os extratos ($p > 0,05$). Para a expressão gênica da *CYP2D6*, foi detectada diferença estatística apenas entre o controle celular e as células tratadas com o extrato MR * ($p < 0,01$).

Figura VI. 3 - Expressão dos genes (A) *ABCB1* e (B) *ABCG2* em células Caco-2, após o tratamento com os extratos das plantas medicinais em estudo.



Dados apresentados em valor relativo \pm desvio padrão. Os dados foram analisados por teste *t* de Student e correspondem a ao menos três experimentos independentes. Foram detectadas diferenças estatísticas na entre os controles celulares e as células tratadas com os extratos CSc ** ($p < 0,001$), CSi * ($p < 0,01$) e GB ** ($p < 0,001$) para a expressão gênica da P-gp e CSc, CSi, CR, BF e GM * ($p < 0,01$) para a expressão gênica da BCRP.

Considerando que as enzimas do CYP450, em especial a CYP3A4, são muito susceptíveis à modulação da expressão (ASHOUR et al., 2017; BADOLO et al., 2015; TSUJIMOTO et al., 2016), a não detecção de variações na expressão gênica após o tratamento poderia estar associada ao tempo de incubação utilizado. Como apresentado no Capítulo V, alguns extratos modularam os sistemas repórteres desenvolvidos para a avaliação da expressão, tanto da CYP3A4 como da CYP2D6, indicando que isso acontece, em algum momento, após a exposição aos extratos. Uma discussão mais detalhada sobre quais extratos já foram descritos na literatura como sendo capazes de modular a expressão da CYP3A4 foi apresentada no Capítulo V juntamente com os resultados de expressão obtidos com os sistemas repórteres.

A disponibilidade do RNAm para a quantificação está associada à sua estabilidade, e análises pontuais podem gerar resultados pouco precisos devido à rápida variação na quantidade de RNAm em função da sua degradação (LABNO; TOMECKI; DZIEMBOWSKI, 2016; SCHWANHAUSSER et al., 2011). Sabe-se que cada RNAm tem uma estabilidade intrínseca, sob determinada condição biológica, e que os transcritos podem ser mantidos disponíveis por apenas alguns minutos ou até por dezenas de horas posteriormente à sua produção (CHEN; EZZEDDINE; SHYU, 2008). Diversos fatores contribuem para a estabilidade do RNAm, desde dos inerentes aos indivíduos, como polimorfismos genéticos para a região 3'-UTR que alteram a afinidade do RNAm às proteínas das vias de sua degradação, até a modulação da estabilidade por xenobióticos (GOW; CHINN; KROETZ, 2008; YAGUE et al., 2003).

As meia-vidas dos transcritos das enzimas do CYP450 descritos na literatura são bastante variáveis. Os transcritos dessas enzimas podem se manter estáveis por mais de 24 h ou serem rapidamente degradados em aproximadamente 2 h após a indução da expressão (LEKAS et al., 2000; LI et al., 2012). Conforme o estudo de Li e colaboradores (2012) utilizando células HepaRG, a meia-vida dos transcritos da CYP3A4 foram de no máximo 3,7 h. Genies e colaboradores (2013) avaliaram a expressão gênica das enzimas do CYP450 em células HepG2 e observaram que os máximos de indução ocorrem, precocemente, entre 2 e 6 h após a indução da expressão, decaindo em seguida para níveis praticamente basais. Sendo assim, a alteração na

expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 nas células Caco-2 pode ter ocorrido, mas não ter sido detectada devido ao tempo de análise adotado, no qual o RNAm produzido já havia sido degradado.

A rifampicina, utilizada como controle positivo, também não induziu a expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6 no tempo testado ($p > 0,05$), embora esse fármaco tenha induzido os sistemas repórteres transfectados com as regiões promotoras dos genes dessas enzimas (Capítulo V). Como os sistemas repórteres se baseiam na quantificação da proteína GFP, e não do RNAm, a maior estabilidade proteica em relação à do RNAm permite sua detecção por um período mais abrangente (CHUDAKOV et al., 2010; VOGEL; MARCOTTE, 2012). Harmsen e colaboradores (2008), utilizando o mesmo tempo de tratamento empregado neste trabalho, porém analisando células HepG2, também não observaram indução da expressão gênica da CYP3A4 pela rifampicina. Em conjunto, esses dados reforçam a contribuição do tempo de incubação nos resultados obtidos.

Até o momento, não foram encontrados estudos nas bases de dados consultadas sobre a atividade do extrato de *Matricaria recutita* na expressão gênica da CYP2D6, único extrato com o qual se obteve indução significativa da expressão gênica dessa enzima nas condições utilizadas neste trabalho ($p < 0,05$). Uma possível explicação para o resultado observado, considerando o exposto anteriormente sobre a estabilidade do RNAm, estaria na indução da expressão da CYP2D6 por algum metabólito do extrato de *Matricaria recutita* produzido durante o tempo de incubação.

Para alguns fármacos, é descrita na literatura a ação de seus metabólitos na modulação da expressão, tanto de enzimas do CYP450 quanto de transportadores, como por exemplo o que acontece com a carbóximefloquina, que é o metabólito majoritário do antimalárico mefloquina (PIECADE et al., 2015). Assim como para os fármacos, os compostos naturais podem ser biotransformados gerando produtos com características farmacocinéticas e bioativas que podem diferir daquelas dos composto de origem (ZENG et al., 2017). Deste modo, essa suposição tem amparo científico.

Alguns estudos demonstraram inibição da expressão de RNAm da CYP2D1 em ratos, homóloga à CYP2D6 humana, após três dias de tratamento com o extrato etanólico de *Echinacea purpurea*, e curiosamente, indução da expressão após dez dias de

tratamento com o mesmo extrato (MROZIKIEWICZ et al., 2010). Em outro estudo realizado com o extrato de soja, verificou-se que o mesmo não teve efeito sobre a expressão do gene da CYP2D1 após três dias de tratamento, mas também induziu a expressão do RNAm da enzima após dez dias de tratamento (BOGACZ et al., 2014).

Embora a maioria dos extratos testados não tenha alterado a expressão gênica das enzimas CYP3A4 e CYP2D6, ou não tenha sido possível detectá-la, a expressão gênica dos transportadores P-gp e BCRP foi detectada/modulada por parte dos mesmos. Os resultados obtidos para os transportadores podem ser fruto de uma maior estabilidade dos seus RNAm quando comparada à estabilidade dos transcritos das enzimas metabólicas.

Gow e colaboradores (2008) analisaram a meia-vida dos transcritos da P-gp e demonstraram que os transcritos foram detectados em quantidades superiores às do controle 24 h após a indução da expressão em células HEK293 (células de rim de embrião humano), possuindo meia-vida de aproximadamente 9,4 h. Em células Caco-2, a meia-vida desse RNAm é ainda maior, aproximadamente 12,8 h (YAN et al., 2016). Para transcritos do gene *ABCG2* uma degradação do RNAm de apenas cerca de 20% foi detectada após 8 h da sua produção em células MCF-7/MX100, indicando uma estabilidade relativa considerável (LI et al., 2011). Sendo assim, as variações na expressão dos RNAm dos transportadores pode ter sido detectada mesmo 24 h após o último estímulo modulador, pelo fato dos transcritos desses transportadores serem mais estáveis que os das enzimas, e ainda não terem sido degradados no tempo de análise escolhido.

Avaliações da expressão gênica dos transportadores, P-gp e BCRP, expostos à rifampicina também foram efetuadas neste trabalho. Contudo, do mesmo modo que para as enzimas, não foi detectada alteração nas suas expressões gênicas ($p > 0,05$) (dados não mostrados). Esses dados concordam com o observado por Brück e colaboradores (2017) em um estudo no qual a rifampicina não induziu nem a expressão gênica nem a expressão proteica da P-gp e da BCRP.

Com relação à P-gp, os extratos de CSc ($p < 0,01$) e GB ($p < 0,01$) atuaram inibindo significativamente a expressão de *ABCB1*, enquanto que o extrato CSi ($p < 0,05$) a induziu, também de forma significativa. Para o gene *ABCG2*, os extratos CSi, CR,

BF, GM inibiram significativamente sua expressão ($p < 0,01$), enquanto que o extrato CSc a induziu também significativamente ($p < 0,01$).

Não foram encontrados, até o momento, estudos nas bases de dados consultadas sobre a modulação da expressão gênica da P-gp pelos extratos de *Cynara Scolymus* e *Camellia sinensis*. Entretanto, para o extrato de ginko (GB), que inibiu a expressão gênica da P-gp nas células Caco-2, resultados semelhantes foram descritos utilizando células de tumor ascítico (HU et al., 2016; ZHANG et al., 2015) e cérebro de ratos (ZHANG et al., 2015), após o tratamento com extratos de *Ginkgo biloba*. Em estudos com humanos, a administração de dose única do extrato de ginko não alterou a farmacocinética do talinolol, substrato da P-gp; entretanto, o uso prolongado do extrato aumentou a concentração plasmática do mesmo (FAN; MAO; et al., 2009; FAN; TAO; et al., 2009). Os efeitos observados foram atribuídos à inibição da atividade da P-gp, mas se considerarmos a possibilidade de o extrato inibir também a expressão gênica dessa proteína de efluxo *in vivo*, este poderia ser o mecanismo ou um mecanismo paralelo que explicaria a alteração na farmacocinética do talinolol.

Não foram encontrados trabalhos relacionados diretamente à modulação da expressão do gene *ABCG2* pelos extratos de *Cynara scolymus*, *Camellia sinensis*, *Cimicifuga racemosa*, *Bauhinia forficata* e *Glycine max*. Contudo, para *Glycine max* e *Cimicifuga racemosa* um mecanismo de indução pode ser sugerido, com base em trabalhos já realizados. Bogacz e colaboradores (2014) demonstraram que o extrato de *Glycine max* induziu a expressão de AhR em ratos, e é sabido que a indução desse receptor em células Caco-2 causa um aumento da expressão do RNAm do gene *ABCG2* (EBERT; SEIDEL; LAMPEN, 2007). Assim, esse seria um mecanismo aceitável para a indução da expressão de *ABCG2* pelo extrato GM. As isoflavonas, presentes na soja, são caracteristicamente indutoras de AhR, o que reforça essa ideia (BIALESOVA et al., 2015). Como a ativação de AhR também é descrita para o extrato de *Cimicifuga racemosa* (JEUKEN et al., 2003), a indução por esse extrato poderia compartilhar o mesmo mecanismo sugerido para o extrato de *Glycine max*.

A indução da expressão de *ABCG2* pela quercetina já foi relatada e sugeriu-se que a mesma ocorre também via AhR

(BHUTTO et al., 2018; EBERT et al., 2007). A quercetina é um dos constituintes do chá-verde (*Camellia sinensis*), e poderia estar envolvida na indução da expressão gênica observada para o extrato desta planta (FANG et al., 2017) (Capítulo IV).

Embora tenha sido observada diferença significativa na expressão dos transportadores e na expressão da CYP2D6 após o tratamento com alguns dos extratos, o significado biológico das alterações verificadas deve ser melhor investigados, pois foi detectada uma variação relativa menor do que duas vezes quando comparada ao controle.

Considerando os resultados significativos relativos à expressão gênica dos transportadores, os dados indicaram que a mesma é modulada pelos extratos, o que possivelmente teria reflexo na expressão proteica dos transportadores. De modo geral, a extrapolação de dados referentes à abundância de transcritos para a expressão proteica e efeito biológico é questionada, sendo recomendado o uso de outras abordagens juntamente com a quantificação de transcritos para obter resultados mais fidedignos (LIU; BEYER; AEBERSOLD, 2016). Sendo assim, a expressão proteica dos transportadores P-gp e BCRP foi analisada por marcação com anticorpos específicos e por citometria de fluxo.

A expressão proteica das enzimas metabólicas CYP3A4 e CYP2D6 não foi avaliada, visto que as células Caco-2 possuem caracteristicamente uma baixa expressão das enzimas CYP450, sendo esse um dos motivos pelos quais são utilizados outros tipos celulares ou aplicadas diferentes estratégias experimentais para o estudo das CYP450 *in vitro*, como já descrito no decorrer desse trabalho (AWORTWE et al., 2014; VAESSEN et al., 2017).

Desta forma, devido ao fato da baixa expressão enzimática das CYP450 pelas células Caco-2 e da possível baixa sensibilidade do método de marcação por anticorpos nessas condições, não se efetuou a quantificação proteica das enzimas. No entanto, análises complementares foram executadas utilizando os sistemas repórteres apresentados no Capítulo V.

A seguir, serão discutidos os dados referentes à modulação da expressão proteica da P-gp e da BCRP, após o tratamento das células Caco-2 com os diferentes extratos por 24 h.

3.4 Expressão proteica dos transportadores P-gp e BCRP

Para verificar a possível interferência dos extratos e/ou do processo de preparação das amostras nas leituras de fluorescência por citometria de fluxo, células Caco-2 foram tratadas, fixadas e permeabilizadas, mas não foram marcadas com anticorpos para realizar a citometria de fluxo.

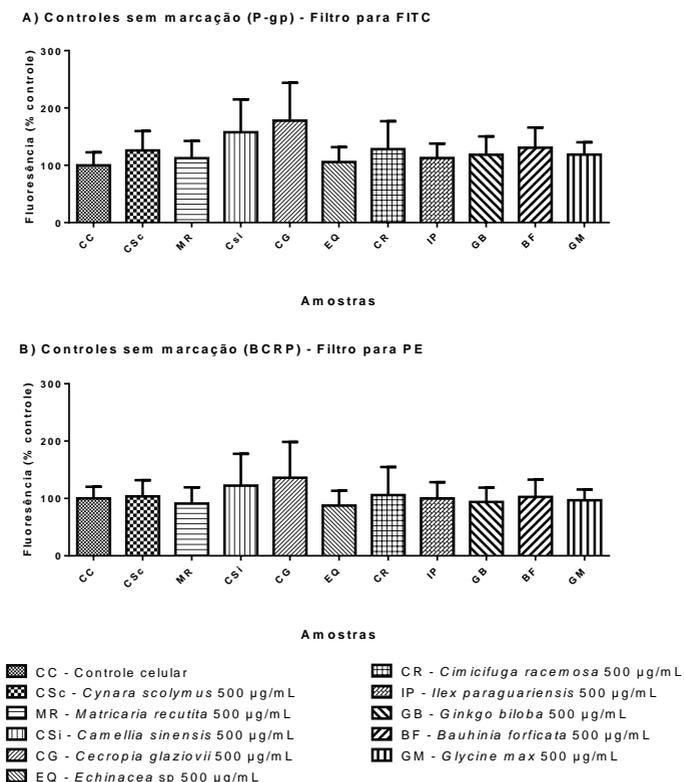
Como pode ser visto na Figura VI. 3, não foram detectadas diferenças significativas na fluorescência ($p > 0,05$) entre as amostras tratadas e o controle celular para as leituras utilizando, tanto o filtro para PE – Ficoeritrina (564 - 606 nm) como o filtro para FITC – Isotiocianato de fluoresceína (515 - 545 nm). Observou-se, deste modo, que o método de preparação das amostras e o tratamento com os extratos não interferem nas análises de fluorescência por citometria de fluxo, permitindo o uso dessa metodologia para o fim proposto.

Mesmo que as células do controle negativo, tratadas e não marcadas com os anticorpos, não tenham apresentado diferenças significativas na fluorescência mensurada, as médias dos valores basais de fluorescência foram subtraídas dos valores de fluorescência obtidos para as células tratadas e marcadas com anticorpos. Desta forma, foi removida qualquer possível interferência dos extratos nas medidas de fluorescência e os resultados obtidos referem-se apenas à modulação da expressão proteica.

Comparando os níveis de expressão proteica dos controles marcados na Figura VI. 4, os quais tiveram sua expressão de fluorescência normalizada pelos respectivos controles celulares não marcados, pode ser verificada uma maior marcação da P-gp (aproximadamente 200%), quando comparada à marcação da BCRP (aproximadamente 12%). A maior marcação pode ser indicativa de uma maior expressão da P-gp em células Caco-2 em comparação com a expressão proteica da BCRP. Esse maior nível de expressão proteica da P-gp também foi verificado por Brück e colaboradores (2017) em células Caco-2, referendando os dados apresentados neste trabalho.

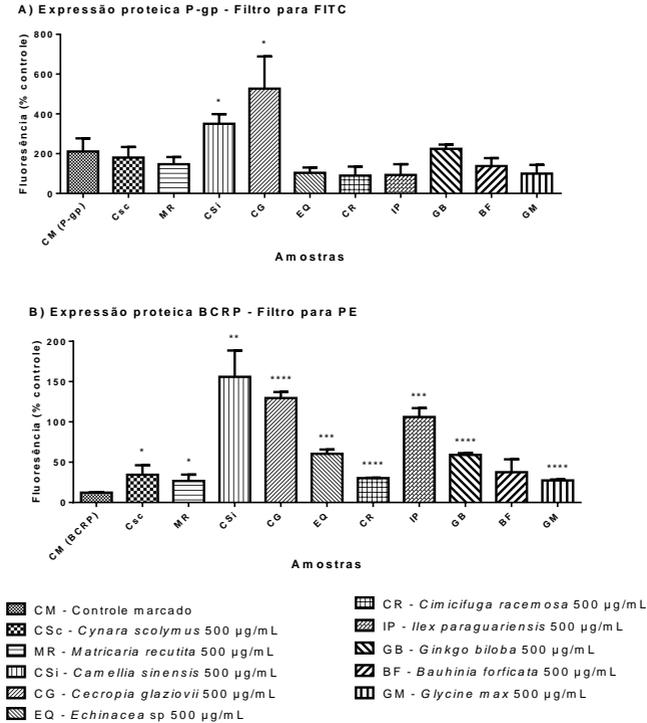
Nas Figuras VI. 5A e B podem ser visualizados os dados de expressão proteica da P-gp e BCRP, respectivamente, após o tratamento das células com os extratos em estudo e marcação com anticorpos específicos. A seguir, os resultados são discutidos separadamente para cada proteína.

Figura VI. 4 - Avaliação da interferência dos extratos em estudo na análise da fluorescência das células por citometria de fluxo em comparação com os controles celulares não tratados e não marcados com anticorpos.



(A) Células tratadas, mas não marcadas com anticorpos anti-P-gp. (B) Células tratadas, mas não marcadas com anticorpos anti-BCRP. Dados apresentados em % de fluorescência ± desvio padrão em comparação com o controle celular não tratado (CC). Os dados foram analisados por teste *t* de Student e correspondem a três experimentos independentes. Não foi observada diferença significativa entre o controle celular e as células tratadas com os extratos e não marcadas com anticorpo tanto anti-P-gp como anti-BCRP ($p > 0,05$).

Figura VI. 5 - Expressão proteica da P-gp e da BCRP avaliada por citometria de fluxo.



(A) Células tratadas e marcadas com anticorpos específicos anti-P-gp. **(B)** Células tratadas e marcadas com anticorpos específicos anti-BCRP. Dados apresentados em % de fluorescência \pm desvio padrão normalizados pelo controle celular não marcado em comparação com o controle não tratado e marcado com anticorpos (CM). Os dados foram analisados por teste *t* de Student e correspondem a três experimentos independentes. **(A)** Foram observadas diferenças significativas entre o controle marcado com anticorpo anti-P-gp e as células marcadas e tratadas com CSi e CG * ($p < 0,05$). **(B)** Foram observadas diferenças significativas entre o controle marcado com anticorpo anti-BCRP e as células marcadas e tratadas com CSc * ($p < 0,05$); MR * ($p < 0,05$); CSi ** ($p < 0,01$); CG **** ($p < 0,0001$); EQ *** ($p < 0,001$); CR **** ($p < 0,0001$); IP; GB **** ($p < 0,0001$); GM **** ($p < 0,0001$).

3.4.1 Modulação da expressão proteica da P-gp

As células tratadas com os extratos CSI e CG e marcadas com o anticorpo anti-P-gp apresentaram maior expressão dessa proteína quando comparadas com o controle celular não tratado ($P < 0,05$). Não foram encontrados, até o momento, nas bases de dados consultadas, relatos da regulação da expressão proteica da P-gp por *Camellia sinensis* (Csi) e *Cecropia glaziovii* (CG). Entretanto, Bhutto e colaboradores (2018) verificaram um aumento significativo na expressão da P-gp, em análises por Western Blotting e por marcação com anticorpos em células Caco-2, após exposição dessas células à quercetina. O tratamento com esse flavonoide aumentou a expressão gênica da P-gp, bem como o efluxo da rodamina 123 *in vivo*. Considerando que o chá-verde (*Camellia sinensis*) possui em sua composição quercetina (FANG et al., 2017) (Capítulo IV), esse composto pode ter sido o responsável ou ter contribuído para o aumento da expressão proteica da P-gp pelo extrato CSI, detectado neste trabalho. O mecanismo pelo qual a quercetina induz a expressão gênica da P-gp em células Caco-2 já foi estudado, sendo que tal indução aparentemente ocorre via o receptor VDR (CHAE et al., 2016).

Em uma investigação utilizando células Caco-2 e ácido cafeico, esse composto foi capaz de aumentar tanto a atividade de efluxo como a expressão gênica da P-gp (HONG et al., 2015). O ácido cafeico é um dos constituintes majoritários da *Cecropia glaziovii*, (COSTA et al., 2011) (Capítulo IV) e, por isso, ele pode ter sido o responsável pela indução observada após o tratamento das células Caco-2 com o extrato CG.

Como já discutido no decorrer deste trabalho, não é possível atribuir um efeito biológico obtido com um extrato a um composto isolado ou grupo de compostos nele contido, por extrapolação dos dados, sem testar experimentalmente tal hipótese. As sugestões apresentadas aqui buscam mostrar quais seriam o(s) composto(s) presentes nos extratos que poderiam ser responsáveis pelos efeitos detectados *in vitro*. Contudo, mais estudos são necessários, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*, para o entendimento dos efeitos desses extratos sobre a expressão da P-gp.

Os demais extratos testados não modularam a expressão proteica da P-gp, nas concentrações testadas, nas células Caco-2. Porém, em alguns ensaios conduzidos com linhagens celulares

diferentes, foram obtidos resultados modulatórios pelas mesmas plantas medicinais aqui testadas, como descrito a seguir.

O extrato metanólico de *Echinacea purpurea* induziu a expressão gênica e proteica da P-gp em células HepG2 (AWORTWE et al., 2017) e em células HepG2 transfectadas com PXR (AWORTWE et al., 2015). Os resultados divergentes dos apresentados neste trabalho podem estar ligados à diversos fatores, tais como ao sistema repórter e ao tipo celular utilizado, ao tipo de solvente usado para preparar o extrato, ou à concentração testada, que foi aproximadamente cinco vezes maior do que a usada nas células Caco-2 deste trabalho. Como descrito por Awortwe e colaboradores (2017) em seu trabalho, o tempo de incubação com o extrato é outro fator que tem efeito sobre a expressão da P-gp, pois após 12 h de incubação, a indução da expressão da P-gp aumentou significativamente, decaindo em 24 e 48 h após o tratamento.

A inibição da expressão gênica da P-gp pelo extrato de *Ginkgo biloba* foi detectada em células de tumor ascítico de ratos (HU et al., 2016) e em cérebros também de ratos (ZHANG et al., 2015), conforme já citado anteriormente na seção sobre expressão gênica. No entanto, os trabalhos mencionados utilizaram ratos, e as diferenças encontradas podem estar ligadas à diferença de espécie. Além disso, resultados não concordantes foram obtidos com esse extrato até mesmo usando a mesma espécie. Um estudo realizado com um extrato de *Ginkgo biloba* teve efeito oposto ao apresentado nos trabalhos citados anteriormente, tendo induzido a expressão gênica da P-gp em hipocampo de ratos (MROZIKIEWICZ et al., 2014). Sendo assim, a expressão, possivelmente, pode ser tanto espécie-dependente como tecido-dependente.

A indução da expressão gênica e proteica da P-gp foi descrita por Arias e colaboradores (2014) após o tratamento de células Caco-2 com genisteína, por 48 h, um composto derivado da soja. A indução da expressão gênica de homólogos da P-gp em ratos por um extrato de soja (*Glycine max*) também foi relatada na literatura. Interessantemente, tal indução ocorreu em células hepáticas, mas não em células do epitélio intestinal. Deste modo, mesmo tendo sido utilizados modelos de espécies diferentes, os dados relatados concordam com os apresentados neste trabalho, visto que as células Caco-2 também são células de intestino (cólon).

Não foram encontrados, até o momento, nas bases de dados consultadas estudos sobre a modulação da expressão proteica da P-gp pelos extratos de *Cynara scolymus*, *Matricaria recutita*, *Cimicifuga racemosa*, *Ilex paraguariensis* e *Bauhinia forficata*. Com base nos resultados expostos, é importante investigar a atividade dos extratos de *Camellia sinensis* e *Cecropia glaziovii in vivo*, pois os mesmos podem ser moduladores da expressão proteica da P-gp em humanos, causando interações importantes com diversos fármacos.

3.4.2 Modulação da expressão proteica da BCRP

Como demonstrado na Figura VI. 5A, a expressão proteica da P-gp ocorreu apenas com dois dos dez extratos testados. Porém, a expressão proteica da BCRP foi modulada, significativamente, em maior ou menor intensidade, por nove dos dez extratos testados [CSc e MR ($p < 0,05$); CSi ($p < 0,01$); EQ ($p < 0,001$); CG; CR; IP; GB; GM ($p < 0,0001$)].

Não foram encontrados, nas bases de dados consultadas, relatos da modulação da expressão proteica da BCRP pelo uso do extrato de *Camellia sinensis*; porém, um trabalho de Ebert e colaboradores (2007) mostrou a indução da expressão gênica e proteica da BCRP em células Caco-2 pela quercetina (50 μM), que faz parte da constituição química do chá-verde. Nesse mesmo estudo, também foi avaliado o potencial de modulação da epicatequina, outro composto presente tanto na *Camellia sinensis* (Capítulo IV) como na *Cecropia glaziovii* (COSTA et al., 2011). A epicatequina não alterou a expressão gênica da BCRP, mas reduziu a sua expressão proteica. Entretanto, a inibição da expressão proteica observada pode ser resultante da concentração utilizada (50 μM), visto que em concentração mais baixa (25 μM) o composto não modulou essa expressão (EBERT et al., 2007).

O extrato de equinácea (EQ) também induziu significativamente a expressão proteica da BCRP, a qual foi detectada após 24 h de incubação ($p < 0,001$), concordando com o descrito na literatura por Awortwe e colaboradores (2017). Após 12 h de incubação com o extrato de *Echinacea purpurea*, células HepG2 apresentaram um aumento significativo da expressão gênica e proteica da BCRP, com redução da expressão em 24 e 48 h, mesmo sendo mantida a expressão de RNAm. Além de

demonstrar o acréscimo da expressão da BCRP, os autores também identificaram um microRNA, que atua na regulação da expressão dessa proteína. Segundo eles, uma depleção em miR-655-3p ocorre quando há um aumento na expressão da BCRP causado pelo extrato metanólico de *Echinacea purpurea* (AWORTWE et al., 2017).

O extrato de ginko (GB) também induziu significativamente a expressão da BCRP nas condições experimentais testadas ($p < 0,0001$). A investigação realizada por Tompkins e colaboradores (2010) não detectou indução da expressão gênica da BCRP pelo extrato de *Ginkgo biloba*; entretanto, ao utilizarem um sistema repórter com luciferase ocorreu um aumento de três vezes na ativação do sistema. O extrato de *Ginkgo biloba* é um agonista de receptores AhR, que estão relacionados com a indução da expressão da BCRP. Esses dados concordam com os obtidos neste trabalho, e indicam que a indução da expressão da BCRP nas células Caco-2 pelo extrato GB pode ter ocorrido por ativação dos receptores AhR.

Embora estudos com extratos de soja não tenham sido encontrados nas bases de dados pesquisadas, a modulação da expressão proteica da BCRP, após o tratamento das células Caco-2 com a genisteína, composto majoritário da soja, foi avaliada por Arias e colaboradores (2014), e esse composto não modificou a expressão proteica da BCRP. Outro trabalho, que também tratou células Caco-2, mas com um outro composto da soja, a fitoalexina denominada gliceolina, não demonstrou alteração alguma, tanto na expressão gênica como na proteica da BCRP, após 24 h (CHIMEZIE et al., 2016). Assim, outros agentes ou o sinergismo de compostos podem estar atuando no aumento da expressão da BCRP pelo extrato de *Glycine max*.

Até o momento, não foram encontrados nas bases de dados consultadas estudos referentes à modulação da expressão proteica da BCRP pelos extratos de *Cynara scolymus*, *Matricaria recutita*, *Cecropia glaziovii*, *Ilex paraguariensis*, *Bauhinia forficata* e *Cimicifuga racemosa*. Considerando os resultados obtidos, os extratos testados, exceto o de *Bauhinia forficata*, podem ser possíveis geradores de interações *in vivo*, visto que modularam a expressão da BCRP *in vitro*.

Algumas das plantas medicinais em estudo são frequentemente consumidas concomitantemente aos tratamentos antineoplásicos (ARDAKANI et al., 2016; SANAATI et al., 2016;

VIEIRA, 2008). Assim, a modulação da expressão da BCRP pode interferir diretamente no resultado terapêutico em especial com antineoplásicos, o que por si só mostra o grave risco ao qual os pacientes possam ocasionalmente estar expostos.

3.5 Relação entre a expressão gênica e proteica dos transportadores P-gp e BCRP

Como a síntese proteica é dependente de RNAm, uma forma simples de avaliar a atuação de outros fatores regulatórios no processo de expressão gênica é relacionar a quantidade de proteína expressa com a abundância de transcrito. Como essa relação nem sempre é diretamente proporcional, embora possa se correlacionar, a alteração na relação proteína/transcrito permite sugerir a atuação de mecanismos ou a existência de condições experimentais que estão afetando a expressão proteica. Diversos fatores contribuem para a manutenção do equilíbrio da abundância proteica (VOGEL; MARCOTTE, 2012). Fatores como a estabilidade do RNAm, modificações pós-transcricionais, atuação de microRNAs, degradação proteossomal e estabilidade proteica, podem ser determinantes na regulação da expressão gênica e proteica.

Desta forma, foi estabelecida a relação proteína/transcrito para poder se sugerir os possíveis fatores regulatórios atuantes, que geraram os resultados obtidos neste trabalho. Primeiramente, na Tabela VI. 2 estão apresentadas as concentrações e os tempos de incubação utilizados para cada extrato, assim como os resultados da expressão gênica e proteica dos transportadores, após o tratamento das células Caco-2 com os extratos das plantas medicinais selecionadas. Posteriormente, na Figura VI. 6 são apresentados os gráficos da relação proteína/transcrito.

Tabela VI. 2 - Modulação da expressão gênica e proteica dos transportadores P-gp e BCRP pelos extratos das plantas medicinais em estudo.

		CSc	MR	CSi	CG	EQ	CR	IP	GB	BF	GM	Tempo
P-gp	Conc. µg/mL	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	
	Proteína	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	24 h
	RNA _m	↓	-	↑	-	-	-	-	↓	-	-	24+24 h
	Conc. µg/mL	500	500	300	100	500	500	200	500	400	500	
		CSc	MR	CSi	CG	EQ	CR	IP	GB	BF	GM	Tempo
BCRP	Conc. µg/mL	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	
	Proteína	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	24 h
	RNA _m	↓	-	↑	-	-	↑	-	-	↑	↑	24+24 h
	Conc. µg/mL	500	500	300	100	500	500	200	500	400	500	

Legenda: (↑) Indução; (↓) Inibição; (-) Sem modulação detectada.

Em sua maioria, os resultados obtidos relativos à expressão gênica e proteica da P-gp são concordantes, com exceção dos extratos CG, CSc e GB. Mais divergências nos resultados foram observadas com relação ao transportador BCRP. Entretanto, para alguns extratos que modularam ambas as expressões, os resultados foram concordantes, como no caso dos extratos CSi, CR e GM.

Com relação à P-gp, os extratos CSc e GB reduziram a expressão gênica em comparação aos controles, sem alterações na expressão proteica. Nestes casos, poderia ser considerada a atuação de algum(ns) metabólito(s) de compostos presentes nos extratos, visto que já havia se passado 24 h da última exposição aos extratos.

Para o extrato CG, a ausência de modulação da expressão do RNAm pode estar associada à dois fatores principais: o tempo de incubação dos extratos e a concentração dos mesmos usada nas análises de expressão gênica (100 µg/mL). Essas duas variáveis podem, assim, afetar os resultados finais (SCHWANHAUSSER et al., 2011). É importante ressaltar que as concentrações dos extratos utilizadas para as análises da expressão gênica e proteica não foram as mesmas, em virtude da citotoxicidade apresentada pelos extratos em 48 h (Capítulo II). Por esse motivo, as concentrações dos extratos foram ajustadas para níveis não citotóxicos a fim de se efetuar esses testes com segurança.

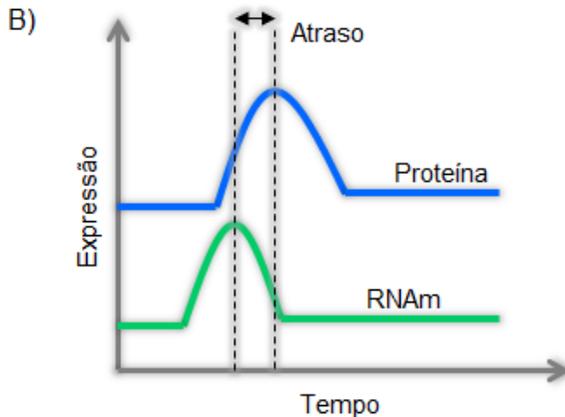
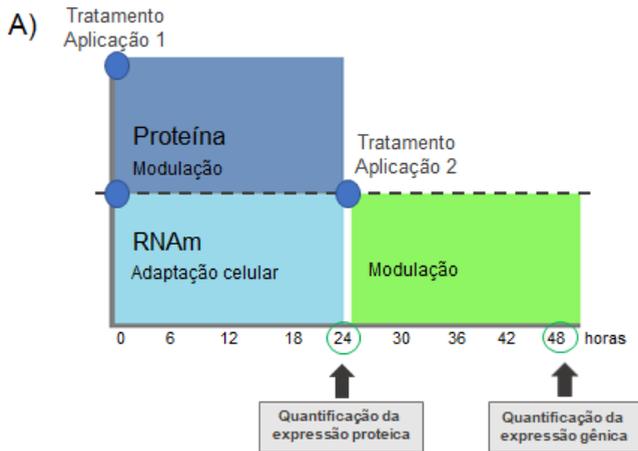
A escolha do esquema de tratamento das células para a posterior análise da expressão, tanto da P-gp como da BCRP, por RT-qPCR seguiu modelos de estudo já descritos na literatura para outros tipos celulares (BADOLO et al., 2015; HARMSEN et al., 2008). Os tempos de incubação utilizados para as análises, tanto de expressão gênica como proteica, levaram em considerações fatores que poderiam limitar a adequada quantificação. Esses fatores podem ser gerados pelo próprio atraso da expressão proteica (Figura VI. 6B), por ações regulatórias sobre a expressão gênica, por modificação da degradação proteossomal em resposta ao estresse celular, ou por atuação prolongada de RNAs mais estáveis (HANNA; FINLEY, 2007; HANSSUM et al., 2014; LIU et al., 2016; SINGH, 2011).

As expressões gênica e proteica são processos dinâmicos permanentemente regulados, e muitos mecanismos estão envolvidos para a adaptação das células a qualquer condição de estresse (VOGEL; MARCOTTE, 2012). Para as análises por RT-qPCR, a utilização do tempo de 48 h, com substituição em 24 h por um tratamento fresco, é uma estratégia lógica para permitir a adaptação das células à nova condição, quando se faz uma perturbação no estado de equilíbrio celular (Figura VI. 5A). Assim, um tratamento curto pode resultar em vieses na quantificação por não oferecer tempo adequado para a adaptação das células à nova condição. A repetição do tratamento permite que as células se adaptem na primeira aplicação e oferece um estímulo repetido para a avaliação da modulação na segunda aplicação, reduzindo possíveis interferências na quantificação por RT-qPCR.

Apesar da aplicação do segundo tratamento, a incubação por mais 24 h pode ainda ter sido demasiadamente prolongada,

para a adequada quantificação dos transcritos que tiveram a expressão induzida. Isso explicaria os resultados observados para os extratos MR, EQ, e GB sobre a BCRP. Como observado na Tabela VI. 2, foi detectada a indução da expressão proteica, mas não a indução da expressão gênica da BCRP.

Figura VI. 6 - Ilustrações representando o esquema de tratamento utilizado (A) e o atraso entre a expressão gênica e proteica (B).



Fonte: A autora.

De modo geral, é estimado que a mediana da meia-vida dos RNAm é de 9 h, enquanto a mediana da meia-vida das proteínas é de 46 h (BENDTSEN et al., 2015; LIU et al., 2016; SCHWANHAUSSER et al., 2011). Isso ocorre porque há necessidade de um tempo para a maturação dos RNAm e para a síntese proteica, gerando um atraso em sua expressão após a produção do transcrito (Figura VI. 6B). Desta forma, após 24 h de incubação com os extratos, foi possível detectar o aumento da expressão proteica, mas pode não ter sido possível verificar variações na expressão dos RNAm, em função dos transcritos já terem sido degradados.

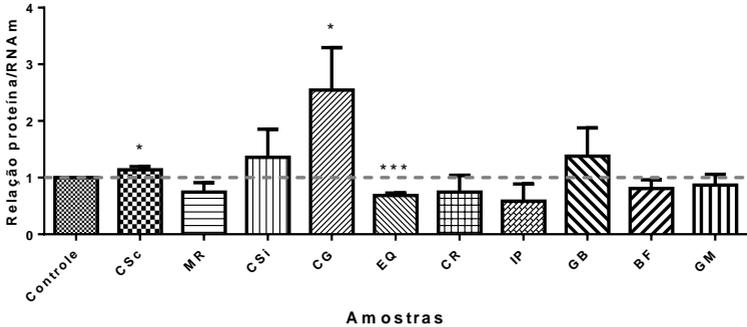
Para os extratos CG e IP, a ausência de indução da expressão gênica pode ter ocorrido pelo exposto anteriormente, ou simplesmente devido à concentração utilizada do extrato, que foi menor do que a utilizada para a avaliação da expressão proteica. Já para o extrato BF, algum metabólito poderia estar atuando como indutor da expressão gênica.

Mecanismos regulatórios estão envolvidos na manutenção do equilíbrio do estoque de proteínas nas células. O equilíbrio pode ser mantido por meio de regulações bem caracterizadas, como por *feedback* negativo, uma função compensatória em que a proteína produzida atua inibindo sua própria transcrição. A regulação também pode ocorrer via mecanismos mais complexos, nos quais a proteína atua inibindo a tradução ou o RNAm inibe a transcrição do próprio gene (BENDTSEN et al., 2015; SINGH, 2011). Para a BCRP, foi observada a indução da expressão proteica após o tratamento com o extrato CSc, enquanto ocorreu uma inibição da expressão gênica. Neste caso, um *feedback* negativo poderia estar atuante para a manutenção do estado de equilíbrio celular.

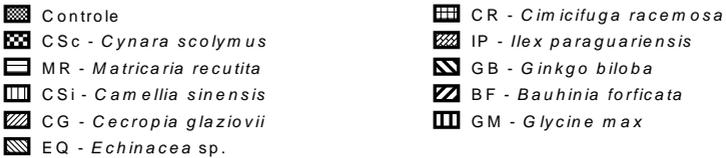
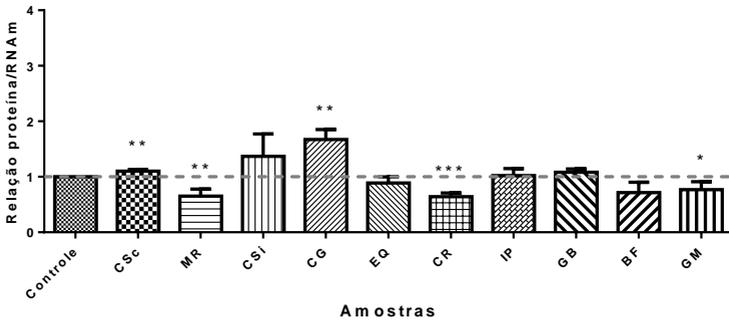
Tendo sido estabelecidas as relações entre proteínas e transcritos, algumas variações interessantes foram verificadas, e estão apresentadas na Figura VI. 7.

Figura VI. 7 - Relações entre as expressões proteica e gênica dos transportadores (A) P-gp e (B) BCRP, após o tratamento das células Caco-2 com os extratos das plantas medicinais em estudo.

A) Relação da expressão proteica e gênica da P-gp



B) Relação da expressão proteica e gênica da BCRP



Os dados estão apresentados como relação entre a expressão proteica e gênica \pm desvio padrão *versus* os tratamentos aplicados. Os dados foram avaliados por teste *t* de Student em comparação com os controles celulares não tratados. Os dados são representativos de ao menos três experimentos independentes. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Com relação à P-gp, as diferenças das relações, em comparação com os controles, foram significativas para os extratos CSc e CG no sentido positivo ($p < 0,05$) e para o extrato EQ no sentido negativo ($p < 0,001$). Para o extrato CSc, a atuação de metabólitos inibindo a expressão gênica poderia alterar a relação proteína/transcrito; para o extrato CG a baixa concentração utilizada nos ensaios de expressão gênica pode não ter sido suficiente para induzir a expressão. Para o extrato EQ, não é possível sugerir mecanismos, visto que não ocorreu alteração na expressão gênica nem na proteica, em relação aos controles.

Com relação à BCRP, foram detectadas variações significativas no sentido positivo para os extratos CSc e CG ($p < 0,01$) e no sentido negativo para os extratos MR ($p < 0,01$), CR ($p < 0,001$) e GM ($p < 0,05$). A ocorrência de um *feedback* negativo explicaria a modificação na relação entre proteína/transcrito para o extrato CSc (BENDTSEN et al., 2015); o atraso na expressão proteica poderia justificar a menor expressão proteica em relação à do RNAm para o extrato MR; o atraso na expressão proteica, bem como uma inibição na degradação proteossomal, ou na degradação do RNAm anteriormente ao tempo de análise, explicaria os resultados obtidos para o extrato CG (LIU et al., 2016; TSUKAMOTO, 2016). Ainda para o extrato CG, a variação nas concentrações do mesmo pode ter afetado a indução da expressão gênica. Para os extratos CR e GM, a atuação de mecanismos regulatórios pós-transcricionais podem ter tido efeito sobre a relação, visto que tanto a expressão gênica como a proteica foram estimuladas (HARVEY et al., 2017).

Apesar das hipóteses apresentadas, mais estudos são necessários utilizando variações nos tempos de incubação das células com os extratos para a estimativa da relação de expressão, bem como estudos moleculares mais específicos para estabelecer os mecanismos responsáveis pelas alterações, caso elas se mantenham. De qualquer forma, essa análise prévia possibilita sugerir que os efeitos modulatórios da expressão gênica e proteica causados pelos extratos estão sujeitos à mecanismos regulatórios.

4. CONCLUSÃO

Devido ao vasto número de fármacos substratos das enzimas CYP3A4 e CYP2D6, qualquer modificação na expressão dessas

enzimas pode comprometer o tratamento de diversas enfermidades. Assim, entender o comportamento dos moduladores é fundamental para garantir o adequado tratamento dos pacientes. Embora não se tenha detectado por RT-qPCR variações na expressão gênica das enzimas pela maioria dos extratos, provavelmente por um viés metodológico, há grande probabilidade que as modulações ocorram, em virtude dos dados apresentados no Capítulo V, sendo necessários mais estudos para a comprovação desses resultados.

No entanto, foram detectadas modulações na expressão gênica e proteica dos transportadores de efluxo, principalmente da BCRP. No caso dos transportadores, BCRP e P-gp, por serem proteínas superexpressas em alguns tumores e responsáveis pela resistência à diversos fármacos, em especial os utilizados para o tratamento de neoplasias, alterações em sua expressão podem ser decisivas para o sucesso do tratamento do câncer bem como de outras doenças.

Como descrito no decorrer deste capítulo, para muitos dos extratos estudados, não há dados disponíveis sobre sua ação na modulação da expressão gênica e proteica das enzimas metabólicas (CYP3A4 e CYP2D6) e dos transportadores (P-gp e BCRP) investigados. Assim, os dados apresentados neste Capítulo são achados importantes, que podem servir de base para futuras verificações, tanto utilizando outros modelos *in vitro* como *in vivo*, sobre interações entre plantas medicinais e fármacos, seus efeitos na terapia farmacológica e seu impacto clínico.

REFERÊNCIAS

ABREU, R. D. S. et al. Global signatures of protein and mRNA expression levels. **Mol Biosyst**, v. 5, n. 12, p. 1512-26, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20023718> >.

ARDAKANI, M. T. et al. Evaluating the effect of *Matricaria recutita* and *Mentha piperita* herbal mouthwash on management of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A randomized, double blind, placebo controlled clinical trial. **Complement Ther Med**, v. 29, p. 29-34, Dec 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27912953> >.

ARIAS, A. et al. Regulation of expression and activity of multidrug resistance proteins MRP2 and MDR1 by estrogenic compounds in Caco-2 cells. Role in prevention of xenobiotic-induced cytotoxicity. **Toxicology**, v. 320, p. 46-55, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24685904> >.

ASHOUR, M. L. et al. Inhibition of Cytochrome P450 (CYP3A4) Activity by Extracts from 57 Plants Used in Traditional Chinese Medicine (TCM). **Pharmacogn Mag**, v. 13, n. 50, p. 300-8, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28539725> >.

AWORTWE, C.; FASINU, P. S.; ROSENKRANZ, B. Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges. **J Pharm Pharm Sci**, v. 17, n. 1, p.19, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735758> >.

AWORTWE, C. et al. MicroRNA-655-3p regulates *Echinacea purpurea* mediated activation of ABCG2. **Xenobiotica**, v. 48, n. 10, p. 9, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28990842> >.

AWORTWE, C. et al. *Echinacea purpurea* up-regulates CYP1A2, CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of pregnane X receptor pathway. **Xenobiotica**, v. 45, n. 3, p. 218-29, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25377539> >.

BADOLO, L. et al. Evaluation of 309 molecules as inducers of CYP3A4, CYP2B6, CYP1A2, OATP1B1, OCT1, MDR1, MRP2, MRP3 and BCRP in cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture. **Xenobiotica**, v. 45, n. 2, p. 177-87, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183402> >.

BENDTSEN, K. M. et al. The role of mRNA and protein stability in the function of coupled positive and negative feedback systems in eukaryotic cells. **Sci Rep**, v. 5, p. 10, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26365394> >.

BHUTTO, Z. A. et al. Use of quercetin in animal feed: effects on the P-gp expression and pharmacokinetics of orally administrated enrofloxacin in chicken. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 12, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29535328> >.

BIALESOVA, L. et al. Agonistic effect of selected isoflavones on arylhydrocarbon receptor in a novel AZ-AhR transgenic gene reporter human cell line. **Gen Physiol Biophys**, v. 34, n. 3, p. 331-4, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25926549> >.

BOGACZ, A. et al. The influence of soybean extract on the expression level of selected drug transporters, transcription factors and cytochrome P450 genes encoding phase I drug-metabolizing enzymes. **Ginekol Pol**, v. 85, n. 5, p. 348-53, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25011215> >.

BRUCK, S. et al. Caco-2 cells - expression, regulation and function of drug transporters compared with human jejunal tissue. **Biopharm Drug Dispos**, v. 38, n. 2, p. 115-26, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27516347> >.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246619> >.

CHAE, Y. J. et al. Vitamin D Receptor-Mediated Upregulation of CYP3A4 and MDR1 by Quercetin in Caco-2 cells. **Planta Med**, v. 82, n. 1-2, p. 121-30, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26366751> >.

CHARITÉ. **SuperCYP**. Germany: Structural Bioinformatics Group - Institute of Molecular Biology and Bioinformatics, 2017. Disponível em: < <http://bioinformatics.charite.de/supercyp/> >.

CHEN, C. Y.; EZZEDDINE, N.; SHYU, A. B. Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. **Methods Enzymol**, v. 448, p. 335-57, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111184> >.

CHIMEZIE, C. et al. Glyceollin Effects on MRP2 and BCRP in Caco-2 Cells, and Implications for Metabolic and Transport Interactions. **J Pharm Sci**, v. 105, n. 2, p. 972-81, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26296158> >.

CHUDAKOV, D. M. et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. **Physiol Rev**, v. 90, n. 3, p. 1103-63, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664080> >.

COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* Species. **J Braz Chem Soc**, v. 22, n. 6, p. 1096-102, 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v22n6/a14v22n6.pdf> >.

COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Nat Prod Commun**, v. 6, n. 6, p. 913-20, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21815438> >.

DROZDZIK, M. et al. Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. **Mol Pharm**, v. 11, n. 10, p. 3547-55, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25158075> >.

EBERT, B.; SEIDEL, A.; LAMPEN, A. Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate. **Toxicol Sci**, v. 96, n. 2, p. 227-36, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077187> >.

FAN, L. et al. Effect of *Schisandra chinensis* extract and *Ginkgo biloba* extract on the pharmacokinetics of talinolol in healthy volunteers. **Xenobiotica**, v. 39, n. 3, p. 249-54, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19280523> >.

FAN, L. et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract ingestion on the pharmacokinetics of talinolol in healthy Chinese volunteers. **Ann Pharmacother**, v. 43, n. 5, p. 944-9, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401473> >.

FANG, R. et al. Variation of theanine, phenolic, and methylxanthine compounds in 21 cultivars of *Camellia sinensis* harvested in different seasons. **Food Chem**, v. 220, n. 2017, p. 517-26, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27855934> >.

GENIES, C. et al. The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. 11, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24260113> >.

GOW, J. M.; CHINN, L. W.; KROETZ, D. L. The effects of ABCB1 3'-untranslated region variants on mRNA stability. **Drug Metab Dispos**, v. 36, n. 1, p. 10-5, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940136> >.

HAEFELI, W. E.; CARLS, A. Drug interactions with phytotherapeutics in oncology. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 10, n. 3, p. 359-77, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24387348> >.

HAN, Y.; CHIN TAN, T. M.; LIM, L. Y. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the effects of piperine on P-gp function and expression. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 230, n. 3, p. 283-9, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417181> >.

HANNA, J.; FINLEY, D. A proteasome for all occasions. **FEBS Lett**, v. 581, n. 15, p. 2854-61, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418826> >.

HANSSUM, A. et al. An inducible chaperone adapts proteasome assembly to stress. **Mol Cell**, v. 55, n. 4, p. 566-77, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25042801> >.

HARMSSEN, S. et al. Comparison of two immortalized human cell lines to study nuclear receptor-mediated CYP3A4 induction. **Drug Metab Dispos**, v. 36, n. 6, p. 1166-71, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347084> >.

HARVEY, R. et al. Post-transcriptional control of gene expression following stress: the role of RNA-binding proteins. **Biochem Soc Trans**, v. 45, n. 4, p. 1007-14, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28710288> >.

HONG, Y. J. et al. Caffeic acid inhibits the uptake of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) by inducing the efflux transporters expression in Caco-2 cells. **Biol Pharm Bull**, v. 38, n. 2, p. 201-7, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25399682> >.

HU, B. Y. et al. Reversal effect and mechanism of *Ginkgo biloba* exocarp extracts in multidrug resistance of mice S180 tumor cells. **Exp Ther Med**, v. 12, n. 4, p. 2053-62, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27698692> >.

JEUKEN, A. et al. Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 18, p. 5478-87, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12926901> >.

LABNO, A.; TOMECKI, R.; DZIEMBOWSKI, A. Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 12, p. 3125-47, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27713097> >.

LEKAS, P. et al. The human cytochrome P450 1A1 mRNA is rapidly degraded in HepG2 cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 384, n. 2, p. 311-8, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368318> >.

LI, D. et al. The role of CYP3A4 mRNA transcript with shortened 3'-untranslated region in hepatocyte differentiation, liver development, and response to drug induction. **Mol Pharmacol**, v. 81, n. 1, p. 86-96, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998292> >.

LI, X. et al. Breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (hsa-miR-328, -519c and -520h) and their differential expression in stem-like ABCG2+ cancer cells.

Biochem Pharmacol, v. 81, n. 6, p. 783-92, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219875> >.

LIU, Y.; BEYER, A.; AEBERSOLD, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 535-50, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27104977> >.

MANDA, V. K. et al. Modulation of CYPs, P-gp, and PXR by *Eschscholzia californica* (California Poppy) and Its Alkaloids. **Planta Med**, v. 82, n. 6, p. 551-8, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27054913> >.

MROZIKIEWICZ, P. M. et al. Screening for impact of popular herbs improving mental abilities on the transcriptional level of brain transporters. **Acta Pharm**, v. 64, n. 2, p. 223-32, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24914722> >.

MROZIKIEWICZ, P. M. et al. The influence of a standardized soybean extract (*Glycine max*) on the expression level of cytochrome P450 genes *in vivo*. **Ginekol Pol**, v. 81, n. 7, p. 516-20, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20825053> >.

MROZIKIEWICZ, P. M. et al. The effect of standardized *Echinacea purpurea* extract on rat cytochrome P450 expression level. **Phytomedicine**, v. 17, n. 10, p. 830-3, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374973> >.

MULLER, S. D. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extract of *Cecropia glaziovii* leaves. **J Ethnopharmacol**, v. 185, p. 255-62, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26965365> >.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1559-82, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406449> >.

PIEDADE, R. et al. Carboxymefloquine, the major metabolite of the antimalarial drug mefloquine, induces drug-metabolizing

enzyme and transporter expression by activation of pregnane X receptor. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 1, p. 96-104, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313206> >.

SANAATI, F. et al. Effect of Ginger and Chamomile on Nausea and Vomiting Caused by Chemotherapy in Iranian Women with Breast Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 8, p. 4125-9, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27644672> >.

SANTOS, T. C. D. et al. *In vitro* antiherpes effect of C-glycosyl flavonoid enriched fraction of *Cecropia glaziovii* encapsulated in PLGA nanoparticles. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 75, p. 1214-20, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28415409> >.

SCHWANHAUSSER, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 337-42, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593866> >.

SINGH, A. Negative feedback through mRNA provides the best control of gene-expression noise. **IEEE Trans Nanobioscience**, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020106> >.

STAHLBERG, A. et al. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. **Clin Chem**, v. 50, n. 3, p. 509-15, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726469> >.

TOMPKINS, L. M. et al. A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 11, p. 1754-61, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804740> >.

TSUJIMOTO, M. et al. Inhibitory Effects of Vegetable Juices on CYP3A4 Activity in Recombinant CYP3A4 and LS180 Cells. **Biol**

Pharm Bull, v. 39, n. 9, p. 1482-7, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27582329> >.

TSUKAMOTO, S. Search for Inhibitors of the Ubiquitin-Proteasome System from Natural Sources for Cancer Therapy. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 64, n. 2, p. 112-8, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26833439> >.

VAESSEN, S. F. et al. Regional Expression Levels of Drug Transporters and Metabolizing Enzymes along the Pig and Human Intestinal Tract and Comparison with Caco-2 Cells. **Drug Metab Dispos**, v. 45, n. 4, p. 353-360, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28153842> >.

VIEIRA, R. D. C. F. **Estudo do uso de plantas medicinais e/ou produtos à base de plantas medicinais como tratamento complementar, por pacientes atendidos no Centro de Pesquisas Oncológicas – CEPON/SC**. 2008. 176 (Mestrado). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/91763> >.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 4, p. 227-32, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22411467> >.

WALKER, J. M.; RAPLEY, R. **Molecular Biomechanics Handbook**. 2. United States: Humana Press, 2008. 1103 p.

YAGUE, E. et al. P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 12, p. 10344-52, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525496> >.

YAN, J. K. et al. Soybean Oil-Based Lipid Emulsion Increases Intestinal Permeability of Lipopolysaccharide in Caco-2 Cells by Downregulation of P-Glycoprotein via ERK-FOXO 3a Pathway. **Cell Physiol Biochem**, v. 39, n. 4, p. 1581-94, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27627102> >.

ZENG, M. et al. Metabolic pathways and pharmacokinetics of natural medicines with low permeability. **Drug Metab Rev**, v. 49, n. 4, p. 464-476, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28911247> >.

ZHANG, C. et al. Reversal of P-glycoprotein overexpression by *Ginkgo biloba* extract in the brains of pentylentetrazole-kindled and phenytoin-treated mice. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 31, n. 8, p. 398-404, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26228278> >.

CONCLUSÃO GERAL

De modo geral, este trabalho demonstrou que extratos de plantas medicinais são capazes de modular *in vitro* a função e a expressão de transportadores e enzimas que são determinantes para a biodisponibilidade de fármacos. Assim, os extratos testados sugestivamente podem causar interações *in vivo*, comprometendo o sucesso terapêutico e/ou causando efeitos indesejados. Como pode ser visto na Tabela 1, a qual resume os resultados obtidos, todos os alvos foram modulados, em algum nível, por ao menos um dos extratos testados.

A P-gp teve sua expressão gênica e proteica modulada, porém apenas um dos extratos mostrou-se eficiente em alterar sua atividade. A expressão gênica e proteica da BCRP foi afetada por vários extratos, entretanto, semelhantemente à P-gp, sua função não foi comprometida pela maioria dos extratos. A partir desses dados, pode-se sugerir que para os transportadores de efluxo, a modulação da expressão possui papel importante nas interações. Assim, o uso contínuo de agentes causadores de interação aparentemente geraria efeito mais significativo nos resultados terapêuticos que o uso ocasional desses produtos.

Ainda em relação aos transportadores, dois transportadores de influxo (OCT1 e OATP2B1) destacaram-se por, possivelmente, terem suas funções alteradas pelos extratos. Neste caso, como há modulação da atividade, o uso ocasional e concomitante de agentes causadores de interação pode inibir o efeito terapêuticos de substratos destes transportadores devido à redução na biodisponibilidade do fármaco.

Quanto às enzimas CYP3A4 e CYP2D6, foi verificada a modulação da expressão gênica de ambas, utilizando-se os sistemas repórteres desenvolvidos. A CYP3A4 teve sua expressão gênica induzida pelos extratos ativos, o que potencialmente pode aumentar a biotransformação dos seus substratos *in vivo* e poderia gerar falha terapêutica. A CYP2D6, por sua vez, teve redução da sua expressão gênica e também da sua atividade, o que poderia causar efeitos tóxicos dos seus substratos.

Conjuntamente, esses dados confirmam a necessidade de cautela no uso combinado de plantas medicinais e seus derivados concomitantemente com fármacos da medicina convencional; reforçam a urgência de mais investigações usando modelos *in*

vivo; enfatizam a necessidade de mudança da ideia falaciosa popular de que “ o que é natural mal não faz” ; e, principalmente, mostram a necessidade e a relevância de capacitar e alertar os profissionais da área da saúde quanto aos riscos das interações entre plantas medicinais e fármacos e suas consequências para a saúde dos pacientes.

Tabela 1 - Resumo dos resultados da modulação da expressão e da função dos transportadores e enzimas pelos extratos das plantas medicinais em estudo e pelos controles.

	Avaliação	Método	CSc	MR	CSi	CG	EQ	CR	IP	GB	BF	GM	Ver/Halo
P-gp	Expressão gênica	RT-qPCR	↓	-	↑	-	-	-	-	↓	-	-	N/N
	Expressão proteica	ATB	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-	N/N
	Função	Efluxo	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-/↓
OCT*	Função	Permeabilidade	-	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	↑/-
	Avaliação	Método	CSc	MR	CSi	CG	EQ	CR	IP	GB	BF	GM	Curc
BCRP	Expressão gênica	RT-qPCR	↓	-	↑	-	-	↑	-	-	↑	↑	N
	Expressão proteica	ATB	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	N
	Função	Efluxo	↑	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	↓
OATP*	Função	Permeabilidade	↓	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	↑
	Avaliação	Método	CSc	MR	CSi	CG	EQ	CR	IP	GB	BF	GM	Rif
CYP3A4	Expressão gênica	Células não diferenciada	-	↓	-	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	↑
	Expressão gênica	Células diferenciada	-	↑	-	↑	↑	-	-	-	↑	-	↑
	Expressão gênica	RT-qPCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2D6	Avaliação	Método	CSc	MR	CSi	CG	EQ	CR	IP	GB	BF	GM	Rif
	Expressão gênica	Células não diferenciada	-	-	↓	-	↓	↓	↓	-	-	-	↑
	Expressão gênica	Células diferenciada	↓	-	↓	-	↓	-	↓	↓	↓	↓	↑
	Expressão gênica	RT-qPCR	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Função	Enzimas recombinantes	-	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-

* Possíveis transportadores de influxo responsáveis pelos resultados obtidos.

SR = Sistema repórter.

↑ = Aumentou; ↓ = Diminuiu; N = não avaliado; - = Sem diferença significativa em relação ao controle.