

Luã Tainã Costa Reis

**FITOLIGANTES DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINAIS E
ATIVACÃO DO RECEPTOR DO HORMÔNIO TIREOIDIANO**

SALVADOR

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIODIVERSIDADE

FITOLIGANTES DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINAIS E
ATIVACÃO DO RECEPTOR DO HORMÔNIO TIREOIDIANO

Luã Tainã Costa Reis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para a obtenção do título de *Mestre em Genética e Biodiversidade*.

ORIENTADOR: DRA. SUZANA TELLES DA CUNHA LIMA (UFBA)

CO-ORIENTADORA: SILVIA LIMA COSTA (UFBA)

SALVADOR

2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Magnus Regios Dias da Silva

Membro Externo da Banca

Profa. Dra. Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima

Membro Interno da Banca

Profa. Dra. Suzana Telles da Cunha Lima

Orientadora

Salvador

2014

A meus avós, e meu herói avô. Aos meus pais e todos os que contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso e produção destes resultados e para minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Dedico o agradecimento desta etapa primeiramente a Jeová e a Cristo pela vida e para todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para fim deste degrau acadêmico. Agradeço a prof. Dra Suzana pela orientação de todas as etapas da produção destes resultados, além da amizade desenvolvida durante este período. Ao prof. Magnus pelo acolhimento, aprendizado e pela paciência em me guiar cientificamente. Para Geórgia companheira durante os momentos bons e difíceis. Aos meus pais pela educação e todo amor que me foi dado, assim também para os meus avós que me servem de exemplo sempre. Agradeço também Maria Clara e Rolf pelo companheirismo tanto laboratorial quanto social durante os seis meses mais longos de minha vida. Por último, mas não menos especial ou importante, agradeço imensamente a todos os professores e mestres que tive na vida, pois sem eles nunca teria alcançado meus objetivos.

*“O sucesso é ir de fracasso em
fracasso sem perder entusiasmo”*
Winston Churchill

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO _____ 10

REVISÃO DA LITERATURA _____ 10

OBJETIVOS _____ 18

ARTIGO _____ 19

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ 35

ANEXO (PATENTE DEPOSITADA NO INPI) _____ 45

RESUMO

Os receptores nucleares (RN) fazem parte de uma superfamília de fatores de transcrição que são ativos mediante interação com ligantes e controlam amplamente a fisiologia humana através do controle da expressão gênica. Diversas moléculas podem se ligar e alterar a atividade destes receptores, desde cofatores até hormônios, tais como o estrógeno e o hormônio tireoidiano. Devido a essas características, os RN são alvos de pesquisa, principalmente no campo de *drug design* onde moléculas sintéticas são produzidas para causar uma resposta em genes alvo. Além dos hormônios endógenos e das drogas sintéticas, moléculas encontradas em plantas também podem modular estes receptores. O Brasil possui grande biodiversidade e, associado a isto, amplo conhecimento sobre o uso de plantas medicinais. Neste trabalho foram testadas plantas indicadas previamente por levantamento etnobotânico como possíveis ligantes vegetais moduladores do receptor de hormônio tireoidiano. Para tal foram feitos ensaios *in vitro* com o receptor *full length* clonado em *E. coli* e usado em ensaios de gene-reporter para medir possível ativação gênica sobre os genes controlados pelo TR β . Quatro plantas demonstraram capacidade moduladora sobre este receptor: o *Cajanus cajan*, a *Abarema cochliocorpos* e a *Borreria verticillata* e *Stillingia saxatilis*. A descoberta de compostos naturais com capacidade de ativar e inibir genes abre um campo novo na farmacologia e biotecnologia de importância imensurável devido ao grande número de receptores nucleares existentes (mais de 100), que controlam a fisiologia humana, e por isso estão envolvidos com inúmeras patologias.

Palavras chave: receptor nuclear; receptor do hormônio tireoidiano; plantas medicinais; fitoligantes; ensaio do gene repórter

ABSTRACT

Nuclear receptors (NR) are part of a superfamily of transcription factors that are active through interaction with ligands and widely control human physiology through gene expression. Many molecules can bind and change the activity of these receptors, from cofactors to hormones, such as estrogen and triiodothyronine. According to that, NR are targets of research, mainly in the field of drug design, where synthetic molecules are produced to cause a response in target genes. In addition to the endogenous hormones and synthetic drugs, molecules found in plants can also modulate these receptors. Brazil has a great biodiversity and, in addition to that, extensive knowledge about the use of medicinal plants. In this work plants indicated beforehand by ethnobotanical survey as possible plant ligands of thyroid hormone receptor were tested as modulators. With this purpose, in vitro assays were done with full length receptor cloned in *E. coli* and used in gene-reporter assays to measure possible activation of genes controlled by TR β . Three plants demonstrated capacity on modulating this receptor: *Cajanus cajan*, *Abarema cochliocarpus* and *Borreria verticillata*. The discovery of natural compounds with ability to activate and inhibit genes opens a new field in pharmacology and biotechnology of immeasurable importance due to the large number of existing nuclear receptors (more than 100), which control human physiology, and are involved in numerous pathologies.

Key words: nuclear receptor; thyroid hormone receptor; plant ligand; medicinal plant; luciferase reporter assay

1-INTRODUÇÃO

As plantas vem sendo utilizadas desde os princípios da civilização para diversos fins, que variam do tratamento de doenças passando por rituais religiosos e até em marcos históricos da política (Schmidt et al., 2008). A pesquisa de químicos vegetais com propriedades biológicas é bastante frutífera e isso pode ser observado em países industrializados onde cerca de 50% das drogas prescritas são derivadas ou sintetizadas a partir de produtos naturais (Lahlou 2013).

Os receptores nucleares (NR) são proteínas que formam uma superfamília de fatores de transcrição eucarióticos; tem sua função dependente de ligantes e são evolutivamente correlacionados. Estes ativadores transcricionais desempenham um importante papel na sinalização celular através da transdução de sinais nas respostas biológicas e na atividade regulatória da expressão de genes alvos específicos. Esta função é realizada através do recrutamento de complexos co-regulatórios em sítios específicos do genoma em resposta à ligação de pequenas moléculas tais como hormônios esteroides e tireoidianos, ácido retinóico, vitamina D, ácidos graxos e eicosanóides (HELSEN, *et al* 2012; EDWARDS 2000). Os receptores nucleares exibem uma estrutura molecular comum, que é composta por uma região amino terminal NTD (do inglês *amino-terminal domain*) com comprimento e sequência de aminoácidos variáveis de receptor para receptor, um domínio de ligação ao DNA o DBD (do inglês *DNA-binding domain*) que é a região *Signature* destes fatores transcricionais, sendo bastante conservada entre os diferentes tipos de receptores, evidenciando desta forma seu importante papel biológico. Apresentam também um domínio de ligação ao ligante LBD (do inglês *ligand-binding domain*) que se liga as moléculas sinalizadoras específicas de cada receptor e uma região de dobradiça que liga o domínio DBD ao LBD, chamado de dobradiça H (do inglês *hinge*) (CLINCKEMALIE *et al*, 2012; HELSEN *et al*, 2012).

Mutações no DNA desses receptores ou o mau funcionamento causado por outros fatores que regulam este receptor fazem com que o controle genético de genes associados fique desregulado. Desta forma os NR são alvos terapêuticos por serem regulados por ligantes que podem ser substituídos por fármacos agonistas e antagonistas similares às moléculas endógenas.

A descoberta de ligantes vegetais que controlem a atividade de fator transcricional destes receptores nucleares, tanto de forma positiva (aumento da expressão de genes controlados

pelo RN) quanto de forma negativa (diminuição da expressão de genes controlados pelo RN), associado ao fato dos RN regularem a fisiologia humana e estarem relacionados com uma série de patologias em caso de mal funcionamento, dota essa linha de pesquisa com perspectivas extremamente frutíferas e promissoras no Brasil devido à grande diversidade da flora e conhecimento no uso de plantas medicinais pela população, a qual é constituída de indivíduos, em sua grande maioria, de baixo poder aquisitivo. Isso torna o uso de terapias alternativas para tratamento de doenças, como diferentes tipos de câncer e outras patologias associadas a RN, um ramo de extrema importância, tanto científica como social.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR

Os receptores nucleares (NR) são proteínas que desenvolvem um papel fundamental na expressão gênica atuando como fatores de transcrição mediante sinalização de moléculas ligantes, estando envolvidos com diversos aspectos da sinalização celular e fisiologia humana. Essas proteínas compartilham domínios estruturais que são funcionalmente relacionados.

O primeiro e menos relacionado domínio entre os receptores nucleares é o N terminal ou NTD (A/B). Este domínio é flexível e com pouca correlação entre os receptores nucleares, variando amplamente na sequência de aminoácidos. Essa região apresenta um domínio de ativação ligante independente (AF1) que fornece uma superfície de contato para ligação de proteínas reguladoras. No receptor de andrógeno desempenha papel importante na regulação da ativação (GARZA et al 2011; LAVERY & MCEWAN, 2005) gênica.

A capacidade de reconhecimento de sequências de DNA específicas denominadas elementos de resposta ao hormônio, ou simplesmente elemento responsivo (ER), é atribuída ao domínio de ligação ao DNA (DBD) (*E domain*). Esse domínio, entre as diferentes proteínas que fazem parte da família dos receptores nucleares, é o mais conservado.

A estrutura dos NRs proeminente é composta por um cerne de aproximadamente 66 aminoácidos e duas α hélices que interagem diretamente com o DNA no ER, e são

estabilizadas por estruturas denominadas dedos de zinco, onde um átomo de zinco é rodeado por quatro resíduos de cisteína (WEATHERMAN et al 1999). O sulco maior do DNA é reconhecido diretamente pela hélice N-terminal (Hélice 1), que contém uma pequena sequência de aminoácidos chamada P-box para o qual se atribui a especificidade de reconhecimento do ER e da hélice C-terminal (Hélice 2), e sobrepõem-se perpendicularmente a hélice 1 contribuindo na estabilização geral da estrutura proteica e dimerização do receptor (BAIN et al 2007; PAWLAK et al 2012).

A ligação de moléculas aos receptores nucleares classicamente é feita em um região chamada domínio de ligação ao ligante (LBD) ou domínio E. Esse domínio é uma unidade multifuncional atuando em diversos eventos da sinalização pelos receptores, sendo a principal função a ligação do hormônio ou ligante, mas atuando também nas funções de homo e heterodimerização, e fornecendo superfície de contato para os co-reguladores (PAWLAK et al 2012). Apresentam uma relativa conservação de sequência de nucleotídeos, porém não tão marcante quanto o DBD. O LBD é formado por 12 α hélices que fornecem a estrutura tridimensional para o qual o ligante irá se associar, o chamado bolso de ligação ao ligante (LBP). Quando em contato com um ligante agonista, o receptor sofre uma série de mudanças tridimensionais nas quais as hélices H3, H4 e H12 se reorientam posicionando a H12 contra o cerne do LBD, gerando sulcos hidrofóbicos na estrutura proteica, que servirão como superfície de contato para ligação dos co-ativadores no então formado domínio de ativação ligante dependente (AF2) (PAWLAK et al 2012). Essa característica de ativação dos receptores nucleares permite o desenho de drogas antagonistas que bloqueiam estericamente o posicionamento da H12, evitando assim a formação da estrutura Holo e dos sulcos hidrofóbicos, o que impede a ligação de co-ativadores e a ativação transcricional (BOURGUET et al 2000). O DBD e LBD estão ligados através de um domínio pouco conservado entre os receptores e que fornece flexibilidade entre esses domínios que é chamada região da dobradiça (Hinge) (KUMAR & MCEWAN, 2012).

Os NRs podem atuar como homodímeros ou heterodímeros ligando-se a sequências específicas em genes alvos como as regiões acentuadoras e promotoras e, deste modo, recrutar gradualmente co-reguladores transcricionais como os co-ativadores, que incluem modificadores de cromatina: remodeladores de cromatina ATP-dependente, acetilases de histonas e metil-transferases, e os co-repressores que se associam com os NRs em um

estado não ligado e recrutam complexos desatilases de histonas para regiões promotoras de genes alvos, reprimindo assim a expressão gênica (CHEN & ROEDER, 2011).

O modo como os receptores nucleares exercem sua função de fator de transcrição é dependente do contexto celular e fisiológico, assim também como o tipo de ligante que se acopla ao LBD. Como descrito por Kumar & McEwan, (2012) em receptores de hormônios esteroidais (ER) a ligação com ligantes agonistas ou antagonistas ao LBD conduz a diferentes mudanças morfológicas no receptor o que o torna capaz de exercer uma função de regulação positiva ou negativa sobre um determinado grupo de genes alvos. Sendo assim sua resposta modulatória específica nos diferentes tecidos é também dependente do contexto genético e fisiológico no qual se encontra.

Os receptores nucleares estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e enfermidades, estando relacionamos, por exemplo, a cardiopatias e problemas de hipertensão, visto que os receptores dos proliferadores peroxissomais (PPAR) acoplados ao seu ligante agem como antagonista da angiotensina II, desempenhando também uma função antioxidante por evitar a formação de espécies reativas de oxigênio e atuando na supressão de genes pro-inflamatórios, o que de modo geral evita lesões na parede vascular (SANDOVAL *et al*, 2009)

Diversas funções da fisiologia humana estão associadas aos NRs, como os receptores de androgênio (AR). O AR atua no controle do ciclo celular, diferenciação sexual e mudanças na puberdade. Porém, mutações nestas proteínas podem desencadear malformações sexuais, o câncer de próstata e até o câncer de mama (LILIE *et al*, 2003).

2.2 CLASSIFICAÇÃO SISTEMÁTICA DOS RECEPTORES NUCLEARES

Com base na análise filogenética das sequências gênicas, alinhamento de sequência e construção de árvore filogenética, baseada principalmente na conservação dos domínios DBD e LBD a União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica propôs um sistema de nomenclatura que subdividiu a superfamília dos receptores nucleares em seis subfamílias e 26 grupos, em que o nome do gene é dado por um prefixo “NR” seguido de um número que indica a subfamília, uma letra que indica o grupo e outro número que indica o gene específico (GERMAIN *et al* 2006; SANDOVAL *et al*, 2009).

Além disto os NRs também podem ser agrupados de acordo com suas características de ligação ao DNA, e são deste modo classificados em três grupos de acordo com Helsen et al, (2012). O primeiro grupo é formado por receptores que se ligam ao elemento responsivo como homodímeros, e neste estão inclusos os receptores de esteróides tais como o receptor de estrógeno (ER α & ER β), glicocorticóides (GR), progesterona (PR), mineralocorticóide (MR) e andrógeno (AR). O segundo é composto por receptores que se ligam ao elemento de resposta como heterodímeros e que dimerizam com receptores X retinóides (RXR α , RXR β & RXR γ) tais como receptor para vitamina D (VDR) e os receptores dos proliferadores peroxissomais (PPAR). O último grupo é composto por NRs que se ligam como monômeros, como o receptor relacionado ao estrogênio (ERR) e o fator esteroideogênico (SF-1).

2.3 RECEPTORES DO HORMÔNIO TIREOIDIANO (TR)

Os receptores do hormônio tireoídiano estão disseminados por diversos órgãos no corpo humano e desenvolvem uma vasta gama de funções celulares que incluem desde a diferenciação até a proliferação celular. O modo como os receptores nucleares exercem sua função de fator de transcrição é dependente do contexto celular no qual se encontram (PASCUAL & ARANDA 2013).

Os principais hormônios produzidos pela glândula tireoide são a L-tiroxina (T4) e L-triiodotironina (T3), esses por sua vez exercem funções fundamentais para homeostase do organismo participando ativamente da regulação de processos metabólicos. Quando ligados aos receptores do hormônio tireoídiano (TRs), estimulam a expressão de genes específicos, ou reprimem a expressão desses genes pela dissociação hormonal do receptor (GOGLIA *et al* 1999; SARKAR *et al* 2013). O mecanismo clássico de ação dos hormônios tireoídianos, ao qual se atribui seus efeitos no desenvolvimento, crescimento e metabolismo, é dado por meio da ligação dos hormônios tireoídianos aos receptores nucleares e consequente regulação gênica. O TR, quando ligado ao T3, muda de conformação tornando-se ativo, reconhecendo e ligando-se como heterodímero com o RXR (9-*cis*-retinoic acid receptor), ou até mesmo como homodímero, à sequências específicas de seis nucleotídeos chamada de elemento resposta, onde atua na regulação da expressão desse gene (CHEN & YOUNG 2010).

O hormônio T3 se associa ao TR numa região específica dentro do domínio LBD que é conhecida como LBC (Ligand Binding Cavity). O processo clássico para associação e dissociação dos ligantes é através da alfa hélice 12 que forma uma espécie de “portão” molecular na entrada do LBC. No entanto existem outras vias supostas para dissociação dos ligantes mostrando que os ligantes podem se desassociar dos receptores de diferentes maneiras (CUNHA LIMA *et al* 2009)

Os receptores do hormônio tireoidiano (TR) atuam numa série de funções durante desenvolvimento dos eucariontes e suas sequências de aminoácidos são bastante conservadas em diferentes grupos de organismo tais como anfíbios, mamíferos, peixes e aves (GRIMALDI *et al*, 2012). Os receptores são transcritos a partir dos genes *THRA* e *THRB* em dois subtipos α e β respectivamente e podem ser produzidas múltiplas isoformas proteicas, como as TR α 1, TR α 2, TR β 1 TR β 2 que apresentam ampla distribuição pelos tecidos e o TR β 2 que é predominantemente encontrado no eixo hipotálamo-pituitária regulando a transcrição das subunidades do TSH (*thyroid stimulating hormone*) (BASSET *et al* 2003). Eles atuam de forma bastante heterogênea, dependente do contexto celular no qual são expressos, podendo ativar grupos gênicos específicos através do recrutamento de complexos co-regulatórios, histonas acetilases e proteínas para interação com a RNAPol II, ou de modo a reprimir a expressão destes genes pela ligação com complexos co-repressores como desacetilases de histonas (CHEN & ROEDER, 2011; PASCUAL & ARANDA, 2013).

Apesar de seu modo de ação clássico, ligante-dependente ou “holo”, os quais já são bem descritos na literatura, existem evidências que mostram um papel desses receptores na sua forma sem ligante, ou “apo”, no qual exercem um papel repressor da expressão gênica através da ligação com co-repressores e possivelmente atuando no eixo tireoidiano (TR-hipotálamo-hipófise) e do desenvolvimento (BERNAL & MORTE 2013).

Além da clássica ação dos hormônios através dos receptores nucleares, é sabido que estes possuem uma segunda via para exercer seus efeitos, ao qual é denominada via não clássica ou não genômica. Nessa via são observados efeitos sobre compartimentos celulares específicos como as mitocôndrias, onde os hormônios tireoidianos afetam a taxa de transcrição do mtDNA, aumentando a expressão de proteínas que possuem função no metabolismo oxidativo e na regulação da temperatura corporal (BASSET *et al* 2003).

O TR também está associado a algumas doenças como a síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano causadas por mutações no gene do TR β . Todas as mutações descritas no TR β causam diminuição da afinidade ou impedem a ligação do receptor ao ligante (hormônio), sendo que 85% dos casos da síndrome estão ligados às mutações no TR β , (com *hotspots* no domínio de ligação ao ligante LBD), e curiosamente apresentando uma ampla gama de fenótipos tecido-específicos que acredita-se ser devido à heterogeneidade de expressão das isoformas do TR em cada tecido, bem como seus diferentes níveis de expressão, além de interação com outros fatores tais como co-reguladores (ISIK *et al* 2013). O padrão de herança da síndrome é autossômico dominante, com o TR β mutante exercendo um efeito dominante negativo, no qual apresenta capacidade de homodimerizar com o TR β não mutado gerando competição de ligação, ou heterodimerizar com o receptor parceiro RXR causando bloqueio de ligação do TR β não mutado ao elemento de resposta (CARVALHO & RAMOS 2003).

2.4 PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS EM RECEPTORES NUCLEARES

Produtos naturais apresentam grande importância na prevenção e no tratamento de doenças. Eles estão associados com a humanidade desde os tempos mais primórdios, sendo os extratos brutos e semipuros de plantas, animais e microrganismos as únicas alternativas para o tratamento de doenças antes do século 20 (LAHLOU 2013). Em 1897, Arthur Eichengrün e Felix Hoffmann, criaram a primeira droga sintética, a aspirina. Esta droga é derivada de um produto natural, o ácido salicílico, um ingrediente analgésico de ervas medicinais. Pouco tempo depois, em 1928, seguiu-se a descoberta da penicilina por Alexander Fleming (SCHMIDT *et al* 2008). Segundo Rates e colaboradores (2001), cerca de 11% das drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS) são exclusivamente originadas de plantas, e uma parte significativa são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais. Aliado a isso, entre 50 % e 60% das novas drogas na área do tratamento do câncer e 75% na área de doenças infecciosas são originadas diretamente de produtos naturais ou derivados de tais produtos (GULLO *et al* 2006; SCHMIDT *et al* 2008). Mesmo com o grande potencial para produção de novos fármacos provenientes de origem natural, seja pela descoberta de estruturas químicas ou pela utilização de estruturas já conhecidas para modificação, o uso dessa rica informação

biológica ainda é negligenciada e pouco explorada. Das 250 a 500 mil espécies estimadas de plantas, apenas uma pequena parcela desse grupo foi investigada farmacologicamente (RATES 2001).

Estima-se que cerca de 10 mil plantas estão registradas na literatura para usos medicinais, representando uma pequena porcentagem do total sugerido de plantas no planeta, o que evidencia a quantidade de informações biológicas negligenciadas (MCCHESENEY et al 2007). Somente no nordeste do Brasil são descritas 483 plantas com potencial para descoberta de novas moléculas (AGRA et al 2007). Apesar disso o campo da pesquisa sobre ligantes naturais para receptores nucleares está apenas começando a ganhar espaço, e algumas substâncias extraídas de plantas tem sido descritas pela literatura, principalmente para receptores dos hormônios esteroidais.

A guggulsterona, por exemplo, é uma substância da planta *Commiphora mukul* Engl., usada para tratar uma variedade de doenças humanas associadas ao metabolismo de lipídeos, tais como obesidade e dislipidemia, sendo sua ação sugerida como moduladora da atividade de receptores Farnesóides (FXR). Além disso, extratos desta planta têm demonstrado grande afinidade de ligação à receptores de andrógeno (BURRIS et al., 2005).

Na área de fitoandrogênicos, apesar do estudo não ser tão amplo quanto o de fitoestrógenos, algumas espécies brasileiras já demonstraram potencial androgênico em seus extratos, como é o caso da aroeira (QUEIRES et al, 2006). Também a *Cordia multispicata*, planta encontrada no Brasil teve a estrutura de seus triterpenos determinada por ressonância magnética nuclear, como parte do programa de estudos sobre plantas com potencial anti-androgênico de um grupo de pesquisadores da Universidade Prefectural de Hiroshima (KUROYANGI et al 2001).

Outras plantas vêm sendo encontradas com propriedades moduladoras da atividade do AR. É o caso do extrato etanólico de *Eucommia ulmoides* Oliv., uma planta presente na China que possui compostos capazes de modular a expressão gênica do AR, assim também como do ER. Este extrato possui ainda uma característica incomum. Quando os receptores estão em níveis de saturação pelo ligante endógeno Diidrotestosterona (DHT), a associação deste receptor saturado com extrato consegue aumentar ainda mais a atividade transcricional do AR, para além dos níveis alcançados somente pelo receptor ligado à DHT (ONG e TAN, 2007). A *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. uma planta comumente usada na Tailândia

para fins anti-inflamatórios, possui quatro fito-compostos (indole-3-carboxylaldehyde, wedelolactona, luteolina e apigenin), que foram obtidos a partir de extrato vegetal. Estes compostos mostraram capacidade de inibir o crescimento de células tumorais da próstata, suprimindo a resposta do AR de ativação do gene do PSA (Prostate-Specific Antigen). Além disto, esta capacidade de inibição é intensificada quando os compostos são utilizados de modo sinérgico, quando comparado a capacidade inibitória dos compostos individualmente. Este estudo mostra que os extratos vegetais, por possuem uma ampla gama de fito-compostos, podem ser um grande aliado no tratamento de câncer (LIN *et al.*, 2007).

Em pesquisa etnobotânica sobre espécies de plantas tradicionalmente usadas pela população de Salvador (BA) para tratar doenças relacionadas à tireóide, foi observado que dentre as 31 espécies de plantas citadas na investigação cerca de 50% possuem alguma atividade terapêutica e princípios ativos confirmados em literatura (CUNHA LIMA *et al.*, 2008).

Os fitoterápicos estão em lugar de prestígio atualmente, especialmente em países em desenvolvimento onde o serviço médico moderno é pouco acessível e o conhecimento tradicional, das populações indígenas, por exemplo, representa uma grande fonte de conhecimento para descoberta de novos agentes terapêuticos (AGRA *et al.* 2007). O Brasil possui uma conhecida biodiversidade da flora e, associado a isso, um conhecimento popular amplo na área de plantas medicinais devido ao intenso uso pela população. Apesar disso, o nosso país corre o risco de tornar-se importador de matérias primas e reprodutor de formulações fitoterápicas devido à falta de conhecimento científico sobre as nossas espécies (SIMÕES e SCHENKEL, 2002). Assim sendo, o país tem grande potencial para descoberta de fitoligantes que poderão atuar como agonistas ou antagonistas de receptores nucleares, sendo importantes alvos farmacológicos. Além da falta de conhecimento, a defasagem no mecanismo de patenteamento acarreta em perda da propriedade intelectual sobre as espécies de uso medicinal e de importância comercial no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar atividade de extratos vegetais como moduladores do receptor de hormônio tireoidiano.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Obtenção de extratos metanólicos e hexânicos de plantas indicadas em estudo etnobotânico.
- b) Avaliação da atividade moduladora de quatro extratos *Abarema cochliocarpus* (Gomes) Barneby & J.W.Grimes; *Cajanus cajan* (L.) Nillsp; *Borreria verticillata* (L.) G. Mey e *Stillingia saxatilis* Müll.Arg. sobre o receptor do hormônio tireoidiano.
- c) Otimização da técnica de transfecção para identificação de fitoligantes

CAPÍTULO I

ARTIGO PARA SUBMISSÃO A REVISTA: *JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY*
- ISSN: 0378-8741

(A ser traduzido para o inglês)

FITOLIGANTES DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINAIS E ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES DE HORMÔNIO TIREOIDIANO E DE ESTRÓGENO

Luã Tainã Costa Reis^a; Magnus Régios Dias da Silva ^b; Eudes da Silva Velozo^c; Silvia Lima Costa^d; Edson Delgado Rodrigues^e; Suzana Telles da Cunha Lima, ^a.

^aLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

^bLaboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

^cLaboratório de Pesquisa em Matéria Médica, Departamento do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

^dLaboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

^eDepartamento de Ciências da Vida. Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

Autor para correspondência

Luã Tainã Costa Reis

Universidade Federal da Bahia, Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Biologia Geral, Salvador-Bahia, Brasil.

Telefone: 00315532386544

E-mail: lua.taina@hotmail.com

Palavras chaves: Fitoligantes; Receptor do hormônio tireoideano (TR); Receptor do hormônio de estrógeno (ER); Estudo etnobotânico; Ensaio gene repórter.

1. Introdução

Os receptores nucleares (NR) são proteínas que formam uma superfamília de fatores de transcrição eucarióticos que tem sua função dependente de ligantes e são evolutivamente correlacionados (Pawlak et al., 2012). Estes ativadores transcricionais desempenham um importante papel na sinalização celular através da transdução de sinais nas respostas biológicas e na atividade regulatória da expressão de genes alvos específicos. Esta função é realizada através do recrutamento de complexos co-regulatórios em sítios específicos do genoma em resposta à ligação de pequenas moléculas tais como hormônios esteroides e tireoidianos, ácido retinóico, vitamina D, ácidos graxos e eicosanoides (Edwards 2000; Helsen, et al., 2012). Os receptores nucleares exibem estrutura molecular composta por uma região amino terminal NTD com comprimento e sequência de aminoácido variável de receptor para receptor; um domínio de ligação ao DNA (DBD) que é a região *Signature* destes fatores transcricionais, bastante conservada entre os diferentes tipos de receptores, evidenciado o importante papel biológico deste domínio; um domínio de ligação ao ligante LBD (do inglês *ligand-binding domain*) que se liga as moléculas sinalizadoras específicas de cada receptor e uma região de dobradiça que liga o DBD ao LBD, chamado de dobradiça ou domínio (H) *hinge* (Clinckemalie et al., 2012; Helsen et al., 2012). Os principais ligantes para o receptor do hormônio tireoidiano (TR) são hormônios produzidos pela glândula tireoide a L-tiroxina (T4) e L-triiodotironina (T3). Estes hormônios exercem funções fundamentais para homeostase do organismo, participando da regulação de processos metabólicos através da ligação ao TR e do consequente controle da expressão de genes específicos, ou repressão da expressão desses genes (Goglia et al., 1999; Sarkar et al., 2013). Receptores do hormônio tireoidiano estão disseminados por diversos órgãos no corpo humano e desenvolvem uma vasta gama de funções que, a nível celular, vai desde diferenciação até a proliferação. O modo como os receptores nucleares exercem sua função de fator de transcrição é dependente do contexto celular no qual se encontram (Pascual e Aranda 2013). Mutações no DNA desses receptores, ou o mal funcionamento causado por outros fatores que o regulam, desestabilizam o controle dos genes alvo destes receptores, e constituem a base para diversas patologias (Deroo e Korach 2006; Haider et al., 2000; Semple et al., 2006). Desta forma os NR são alvos terapêuticos por serem regulados por ligantes que podem ser substituídos por fármacos agonistas e antagonistas similares às moléculas endógenas (Sladek 2003). A descoberta de ligantes vegetais que controlem a ativação gênica de receptores nucleares positivamente e negativamente é promissora no

Brasil devido à diversidade da flora e do conhecimento popular no uso de plantas medicinais. Neste estudo verificamos a capacidade de extratos vegetais provenientes de plantas indicadas por estudos etnobotânicos em ativar o receptor do hormônio tireoidiano.

2. Materias e métodos

2.1 Prospecção de amostra

As plantas selecionadas para extração foram indicadas por estudo etnobotânico prévio (Cunha Lima et al, 2008, 2012) na comunidade indígena Pataxó do Sul da Bahia (BA); por comerciantes de plantas medicinais da cidade de Salvador - BA (Feira de São Joaquim e de Sete Portas) e por pacientes dos Ambulatórios de Tireoide e de Diabetes, do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (HUPES), na Universidade Federal da Bahia. A partir destes estudos, foram listadas 31 plantas tradicionalmente utilizadas no tratamento de Diabetes mellitus tipo 2, doenças da tireoide, obesidade e cardiopatias, que são doenças associadas às vias de regulação controladas pelo receptor do hormônio tireoidiano (TR). Destas 31, 22 foram coletadas e classificadas com depósito do número de espécie testemunha, ou vouch number. Outro extrato utilizado nesta análise foi a planta vulgarmente conhecida como “incha culhão” (*Stillingia saxatilis* Müll.Arg), cedida pelo Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica, do Departamento do Medicamento da Faculdade de Farmácia (UFBA).

2.2 Extrato hexânico

As plantas foram desidratadas em estufa a 50°C, trituradas em moinho e então tratadas com três banhos de hexano, com duração de oito dias cada, para retirada de substâncias apolares do extrato. Esse solvente da extração foi então rotaevaporado para recuperar e concentrar substâncias apolares extraídas. Após a rotaevaporação completa do solvente, gerou-se o extrato hexânico, o qual foi armazenado a 4°C. Após três extrações, o resíduo do material vegetal, denominado “torta”.

2.2.1 Extrato Metanólico

Após extrações hexânicas, o resíduo do material vegetal, denominado “torta”, seguiu para extração da parte polar do material vegetal, utilizando o metanol como solvente de extração. Foram realizados três banhos de metanol, com duração de oito dias cada e ao final de cada banho, o metanol foi rotaevaporado para concentração das substâncias solubilizadas, e a “torta” metanólica obtida do extrato foi deixada em temperatura ambiente para evaporação completa, seguindo armazenamento a 4°C. Ao final do processamento foram feitas soluções “mãe” de cada extração metanólica dos vegetais, solubilizando em dimetil sulfóxido (DMSO), o qual foi usado como veículo, em concentrações finais de 40.000 ug/mL.

2.1.2 Transformação e purificação

Bactérias DH5 α foram transformadas separadamente com três tipos de plasmídeo CMV (PGK1; TR β ER β) na concentração de 1ng, e cada plasmídeo contendo um gene específico. Um plasmídeo PGK1 contendo o gene da luciferase, outro contendo a sequência do TR β , e um terceiro com a sequência do ER. Bactérias e plasmídeos foram incubados por trinta minutos no gelo, sujeitos a choque térmico por 1 minuto à 42° C, seguido de 2 minutos no gelo. Posteriormente foram adicionadas à 250 ul de meio S.O.C (Invitrogen), incubados por uma hora e meia, à 37° C e agitados à 180 RPMs. Seguido o tempo de incubação o meio foi centrifugado, o pellet de bactérias ressuspense em 50 ul de S.O.C e plaqueado em placas de Petri com meio LB sólido contendo ampicilina (100ug/ml) por 12hs. Uma colônia foi coletada e crescida em 500 ml de meio LB líquido, contendo ampiciilina (100ug/ml) por 12 hs. Em seguida o meio foi centrifugado e os plasmídeos foram purificados conforme protocolo estabelecido por kit Qiagen plasmid Maxi kit

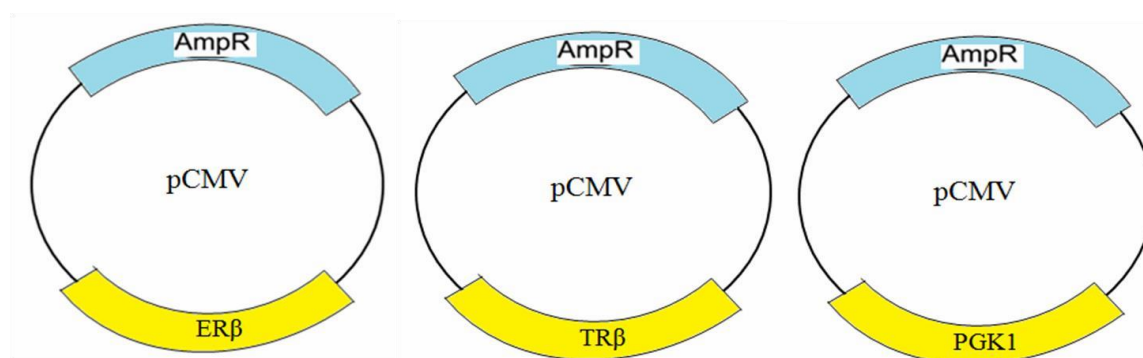


Fig 1. Desenho esquemático dos plasmídeos pCMV usados em experimento. Ambos os plasmídeos, um com o gene do TR β o outro contendo o gene para luciferase, continham também genes de resistência para o antibiótico penicilina.

2.3 Cultivo de células HEK e HeLa

Células renais embrionárias humanas HEK 292 e células de câncer cervical humano HeLa foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO) pH 7,2 suplementado com 1,7g de bicarbonato de sódio, 5 ml de penicilina/estreptomicina 5,000 U/ml (GIBCO), 1 ml de fungizone (GIBCO), HEPES 10 mM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), filtrado em millipore 0,2 µm.

2.4 Ensaio do gene repórter

Para avaliação da expressão dos genes regulados pelos receptores mediante modulação com extratos vegetais foi utilizado o ensaio do gene repórter, que se baseia na emissão de luz pela atividade enzimática da luciferase, cujo gene foi inserido na sequência do elemento responsivo dos plasmídeos citados abaixo, utilizando como controle positivo o receptor TR na presença de T3 sintético (Sigma-Aldrich) ou o ER na presença de 17 β-Estradiol (Sigma-Adrich).

2.5 Transfecção transiente

2.5.1 Transfecção cálcio fosfato

Células HEK foram transfectadas usando o método transfecção pelo cálcio fosfato (Jordan et al., 1996). Inicialmente foram cultivadas em placas de 10 mm até atingir uma confluência de 60%. O meio foi aspirado e as células tripsinizadas com 1ml de tripsina por 3 minutos. O dobro do volume de meio DMEM foi adicionado, e então centrifugou-se por 5 minutos, a 1000 RPM. O pellet foi ressuspenso em 1 ml de meio e distribuído em placas de doze poços contendo 1 ml de meio em cada poço, e as células deixadas para crescer overnight 37°C. Uma hora antes da transfecção o meio de cultura foi trocado por meio DMEM sem soro fetal bovino (SFB). 24 µg de DNA plasmidial total (12 µg de PGK1 e 12 µg de TRβ 1µg de cada plasmídeo por poço) foram adicionadas à 76,25 µl de solução de CaCl₂ [2M] e o volume final completado com água ultra pura para 625 µl. Essa solução foi então adicionada à 625 µl de HEPES (1,6g NaCl, 0,021g de Na₂HPO₄ e 1,3g de HEPES

em 100 ml em pH final de 7,0) com borbulhamento por pipetagem, e deixada por 15 minutos em temperatura ambiente. 100 ul da solução final foi então adicionada a cada poço (da placa de doze) gotejando cuidadosamente a solução. As células foram então incubadas em estufa à 37° C durante um período de duas horas. Após o tempo decorrido, o meio de transfecção foi retirado, as células lavadas 2x com PBS e meio DMEM com SFB foi então repostas.

2.5.2 Transfecção por eletroporação

As células HeLa foram transfectadas pelo método de eletroporação (Neumann et al., 1982). Elas foram cultivadas em placas de 10 mm até confluência de 70%. O meio foi aspirado, as células lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e tripsinizadas com 2 ml de tripsina, por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 8 ml de meio DMEM e contadas em câmara de Neubauer e. Um volume contendo 5×10^6 células foi centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm e o pellet celular ressuspensas em 0,5 ml de tampão de eletroporação (500 ml PBS adicionado 0.1 g/L CaCl_2 , 0.1 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH_2PO_4 , 8.0 g/L NaCl, 2.16 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 5 ml contendo 10% Glucose (50 ul) Transferiu-se as células para uma cuveta e estas foram eletroporadas à 960 nFd (max voltage) e 0.25 kV. O material eletroporado foi transferido para tubos Falcon contendo 11,5 ml de meio DMEM.

2.6 Análise estatística

Para avaliar diferenças estatísticas entre os dados obtidos foi realizado teste de Wilcoxon com valores de significância de $p < 0,05$.

O número amostral foi de três, sendo então avaliações não paramétricas, como teste de amostras pareadas. A expressão gráfica foi realizada com média, desvio padrão e valores dados como conversão em percentual em relação ao controle positivo.

2 Resultados

Das 31 plantas indicadas previamente em estudos etnobotânicos, foram depositadas no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) obtendo assim o número de espécie testemunha, ou *voucher number*, de acordo com a tabela 1.

Os ensaios de triagem (obtidos anteriormente) para testar a capacidade modulatória dos extratos sobre genes controlados pelo receptor do hormônio de estrógeno foram feitos com células da linhagem HeLa, transfectadas por eletroporação com receptor do hormônio de estrógeno (ER). A triagem inicial mostrou que dos extratos etanólicos a 70% das 22 plantas testadas, três (5, 19 e 21) apresentaram um índice de ativação na faixa dos 50%, quando comparado ao controle positivo sintético, o 17 β -Estradiol. O extrato etanólico (70%) de *Cajanus cajan* (L.) Millsp (5) mostrou ativação de 54,4% quando comparado ao controle positivo. A *Abarema cochliocarpus* (19) mostrou ativação de 48,5% e *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (21) apresentou 59,5% de ativação comparada ao controle positivo (Figura 1).

Nome vernacular	Espécie	Família	Número da espécie testemunha
1 Insulina	N.C	N.C	N.C
2 Jamelão	<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	76156
3 Picão com raiz	N.C	N.C	N.C
4 Guine	N.C	N.C	N.C
5 Feijão-andu	<i>Cajanus cajan</i> (L.) Mill	Fabaceae	76098
6 Alecrim do reino	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	76128
7 Caçutinga	N.C	N.C	N.C
8 Sabugueiro	<i>Sambucus australis</i> Cham.	Caprifoliaceae	76145
9 Seni	N.C	N.C	N.C

10 Goiabeira	N.C	N.C	N.C
11 Folha-santa	N.C	N.C	N.C
12 Carqueija	N.C	N.C	N.C
13 Quina-quina	N.C	N.C	N.C
14 Folha de canela	N.C	N.C	N.C
15 Carrapixo	N.C	N.C	N.C
16 Levante	<i>Alpinia nutans</i> Roscoe	Zingiberaceae	76123
17 Alfavaca	<i>Peperomia pellucida</i> (DC.) H.B.K.	Piperaceae	78145
18 Trancagem	N.C	N.C	N.C
19 Barbatimão	Abarema cochliacarpus (Gomes) Barneby & J.W.Grimes	Fabaceae	76158
20 Murici	<i>Byrsonima sericea</i> DC.	Malpighiaceae	78150
21 Tiririca de babado	<i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey	Rubiaceae	76113
22 Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Lauraceae	76099

Tab1. Lista das 22 plantas indicadas por estudo etnobotânico, em questionários preenchidos por pacientes do ambulatório médico do hospital universitário da Universidade Federal da Bahia (HUPES-UFBA) e com vendedores de plantas medicinais em Salvador-Bahia. Todas as plantas foram coletadas com flores para serem classificadas e depositadas em herbário para obtenção do número da espécie testemunha. N.C (Não classificada)

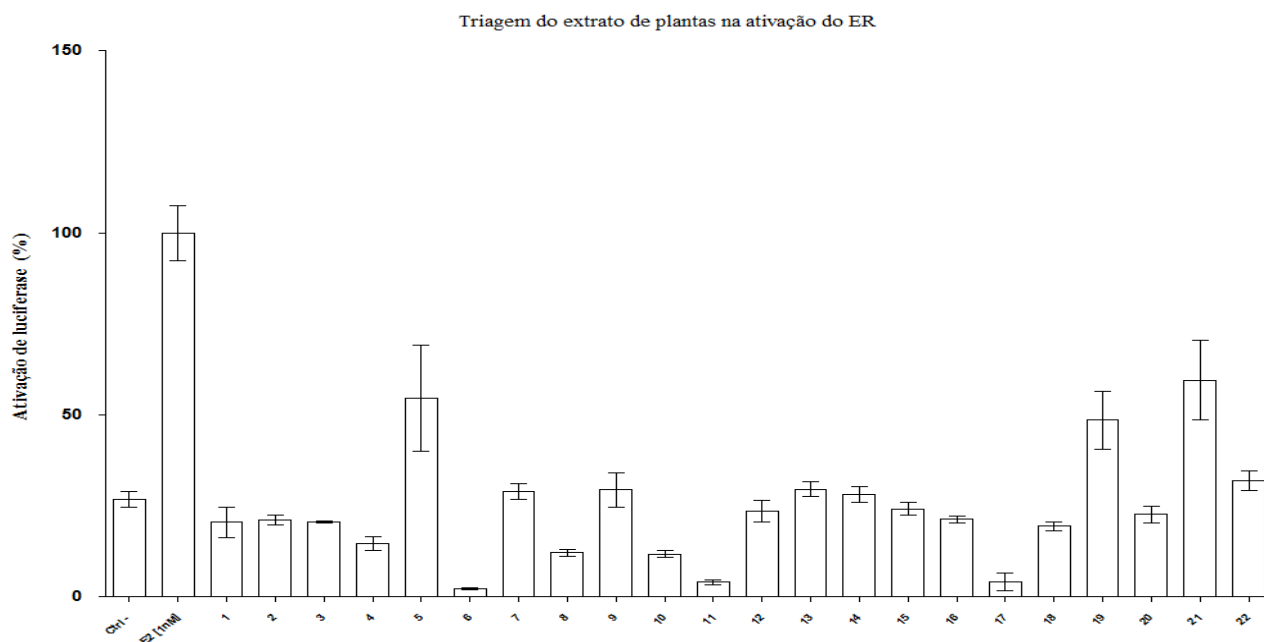


Fig1. Triagem da ativação do ER por 22 extratos etanólicos a 70%, proveniente de plantas indicadas por estudo etnobotânico. Do total das 22 plantas, três apresentaram ativação próxima à metade (50%) da ativação máxima do ER quando modulado pelo ligante endógeno sintético (E2 17 β -Estradiol). Dados são exibidos em porcentagem do controle positivo (17 β -Estradiol) com mediana e desvio padrão. n=3.

Para testes iniciais e padronização da técnica de transfecção para o receptor do hormônio tireoidiano, foi realizada corrida eletroforética em gel de agarose 0.8% com 30 pg de DNA plasmidial de cada gene (TR β PGK1) que mostrou integridade física dos plasmídeos, como observado na figura 2, não havendo também contaminações por proteínas, constatado pela razão da absorção em 260/280 nm que resultou em 1.86 para ambos os plasmídeos.

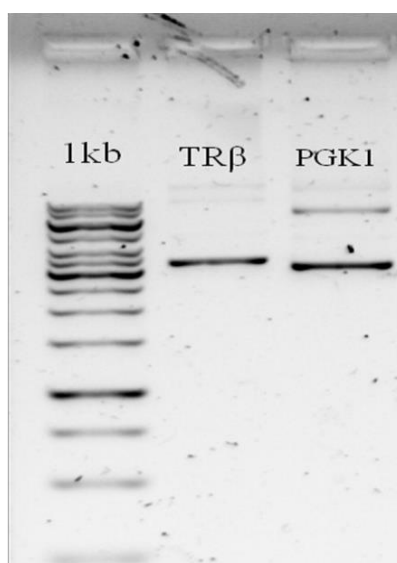


Fig 2. Gel de agarose 0.8% mostrando bandas íntegras dos DNA's plasmidiais com controle DNA plasmidial ladder de 1 kb

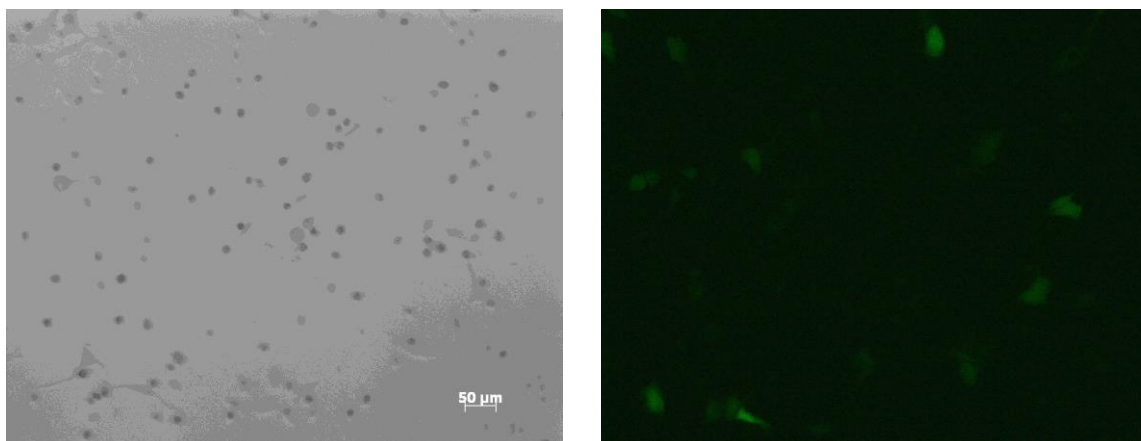


Fig 3. Células HeLa marcadas positivamente para GFP, indicando células transfectadas com sucesso e expressando a proteína verde fluorescente.

As células apresentaram diferenças na eficiência de transfecção em relação à técnica adotada. Inicialmente foram feitos testes de transfecção com plasmídeos pEGFP contendo o gene para proteína verde fluorescente (GFP), no qual a transfecção foi avaliada qualitativamente como positiva ou negativa de acordo com a visualização de células transfectadas (verde fluorescente) em microscopia de fluorescência. Na figura 3 é mostrada apenas células HeLa, as quais após transfecção pela técnica de eletroporação apresentaram marcação positiva para a GFP, indicando transfecção eficiente. Células HEK foram submetidas ao mesmo procedimento de transfecção adotado para células HeLa, porém não houveram transfecções positivas eficientes, dentro dos parâmetros adotados.

Utilizando a técnica de transfecção pelo cálcio fosfato, ambas as linhagens celulares apresentaram transfecção positiva. Com cinco horas e meia de exposição ao tampão de cálcio fosfato as células da linhagem HEK apresentaram-se GFP positivas, com fluorescência acentuada indicando que as células conseguiram incorporar os plasmídeos e expressaram a proteína, porém sob esse tempo de exposição ao tampão de cálcio fosfato as células não resistem e morrem, o que pode ser percebido pela morfologia arredondada das células associado ao fato das células estarem soltas da placa, o que pode ser observado na figura 4. A mesma técnica não conseguiu uma eficiência para células HeLa tão boa quando comparadas às células HEK, o que pode ser observado pela intensidade de luminescência.

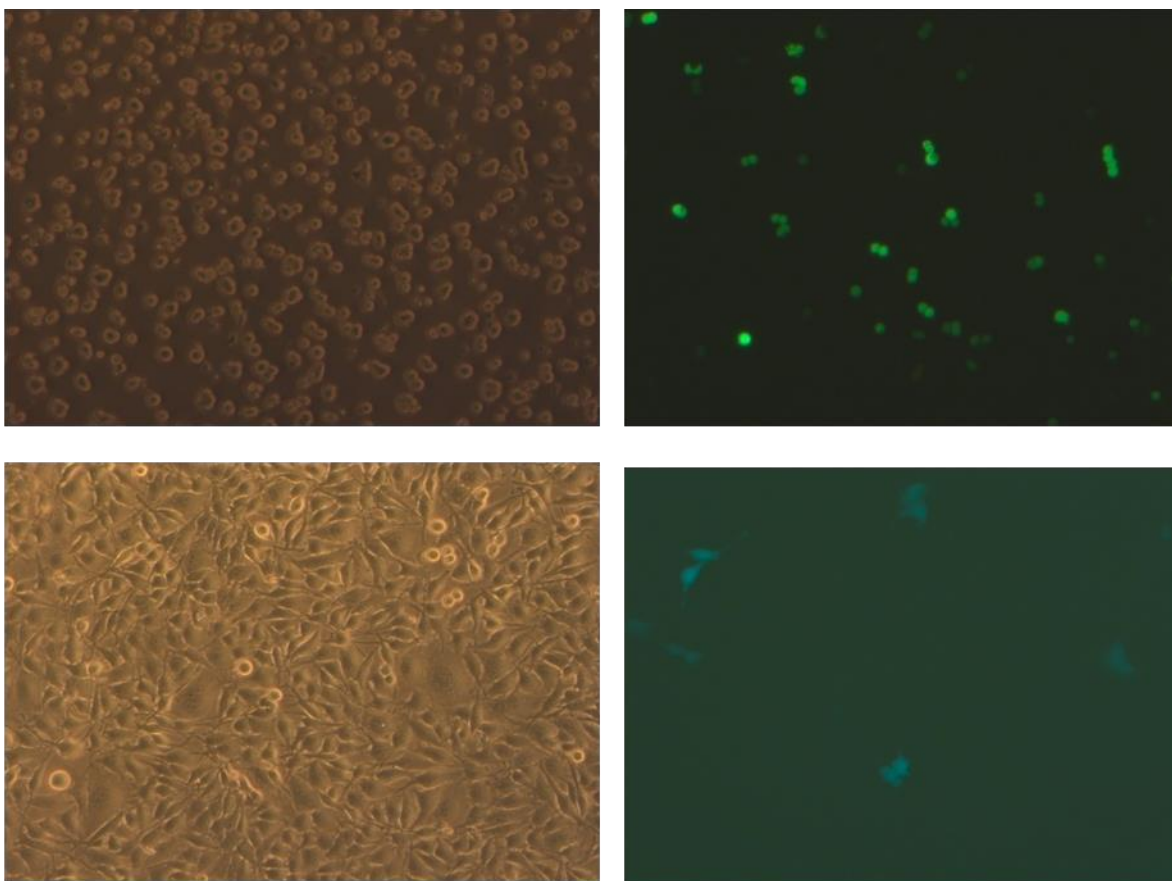


Fig 4. A e B células HEK com cinco horas e meia de exposição ao tampão de cálcio fosfato, mostrando marcação positiva para GFP, indicando células transfectadas com sucesso e expressando a proteína verde fluorescente, porém mortas. Fig 3, C e D células HeLa com cinco horas e meia de exposição ao tampão de cálcio fosfato, mostrando marcação positiva para GFP, com células viáveis.

Planta	Espécie testemunha	Parte usada	Massa inicial	Extrato hexânico	Extrato metanólico
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Nillsp	76098	Folha	1,2 kg	0,187% (2,248g)	2,4% (28,771g)
<i>Borreria verticilata</i> (L.) G. Mey	76113	Folha	1 kg	1,2405% (12,408g)	3,3909% (33,9099g)
<i>Abarema cochilocarpus</i> (Gomes) Barneby & J.W. Grimes	76158	Casca	2 kg	0,2141% (4,282g)	4,19% (83,8537g)

Tab 2. Rendimento dos extratos metanólicos e hexânico de plantas. As plantas e partes utilizadas foram indicadas por estudo etnobotânico. Extratos metanólico a 70% dessas plantas apresentaram ativação próxima aos 50% do controle positivo 100% (17- β Estradiol) em triagem para ativação do receptor do hormônio de estrógeno (ER).

Para testarmos a ativação do TR, o extrato das três plantas com resultado positivo próximo aos 50% da ativação do 17β -Estradiol para ER foram utilizadas, além do extrato metanólico já pronto de *Stillingia saxatilis* Müll.Arg cedida pela faculdade de farmácia. As plantas sujeitas a extração hexânica e metanólica foram a *Abarema cochliocarpus* (Gomes) Barneby & J.W.Grimes; *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. e *Cajanus cajan* (L.) Nillsp, vulgarmente conhecidas como Barbatimão, Tiririca de Babado e Feijão Guandu, respectivamente. O rendimento dos extratos vegetais foi diferente, conforme mostrado na tabela 2.

A *Abarema cochliocarpus* (Gomes) Barneby & J.W.Grimes foi extraída a partir de uma massa de 2 Kg, com rendimento da parte metanólica de 4,19% (83,85 g) e da parte hexânica de 0,21% (4,2 g); *Borreria verticillata* (L.) G. Mey teve um rendimento total de 3,39 % (33,9g) para o extrato metanólico e de 1,24 % (12,4g) para o hexânico a partir de uma massa total de 1 kg. *Cajanus cajan* (L.) Nillsp teve um rendimento total de 2,4 % (28,7g) para o extrato metanólico e de 0,187 % para o extrato hexânico (2,2g) a partir de uma massa total de um quilo e duzentas gramas. 1.2Kg.

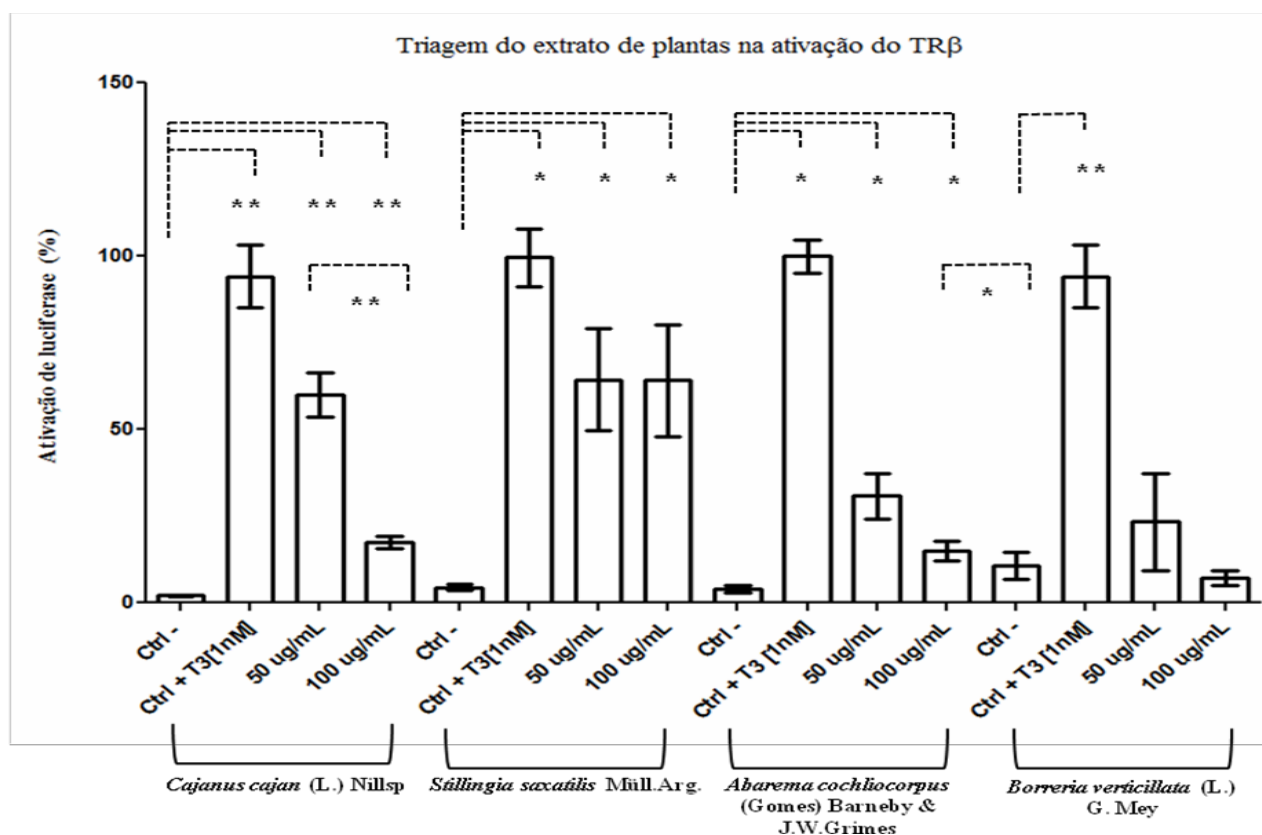


Fig 5. Ativação do TR por quatro extratos vegetais metanólicos. Plantas foram selecionadas a partir de dados prévios dos extratos na ativação do receptor do hormônio de estrogênio. Dados são exibidos em porcentagem do controle positivo (100%) do T3 com mediana e desvio padrão. n=3. ** valores significativos com $p < 0,01$ * valores significativos com $p < 0,05$.

Os extratos apresentaram ampla variação de ativação do TR β mediante modulação. O extrato metanólico de *Cajanus cajan* (L.) Millsp (feijão-guandú) apresentou uma ativação de 59,9 % no tratamento com concentração de 50 ug/ml. O mesmo extrato em concentração de 100 ug/ml apresentou média de 17,4 % de ativação do receptor tireoidiano quando comparado ao controle positivo de T3 sintético como mostrado na figura 5.

O extrato metanólico proveniente de *Stillingia saxatilis* Müll.Arg. apresentou ativação de 64,4 % em concentração de 50 ug/ml e 64% à 100 ug/ml quando em comparação ao controle positivo como mostrado na figura 2B. O extrato metanólico de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey a 50 ug/ml apresentou atividade de 30, 8 % quando comparado com o controle positivo e 14,9 % a 100 ug/ml como mostrado na figura 3A. O extrato metanólico de *Abarema cochliocarpus* apresentou uma ativação média de 23, 3 % a 50 ug/ml e 7,1 % em tratamento com concentração de 100 ug/ml como observado na figura 3B.

4 Discussão

Todos os plasmídeos utilizados para os ensaios de transfecção estavam dentro de limites de qualidades estabelecidos como razão da absorção em 280/260, em absorbância que indicou ausência de contaminação por proteínas. Isso foi confirmado pela, da integridade das bandas no gel, o que mostra não ter ocorrido danos maiores estruturais no DNA (Akerman & Cole 2002; Azqueta & Collins 2013).

As células HeLa, através da técnica de eletroporação foram capazes de incorporar os plasmídeos GFP expressando a proteína verde fluorescente, que pode ser constatado por imagens de microscopia de fluorescência. As células HEK, pelo contrário, não conseguiram expressar GFP pela eletroporação, o que possivelmente pode ter ocorrido pela mortalidade celular devido metodologia de transfecção pela eletroporação (Katryn et al, 1993; Zhao et al, 2006)

A transfecção pelo cálcio fosfato foi bem sucedida, com as duas linhagens de células expressando a proteína GFP. Apesar disso, na exposição de cinco horas e meia ao tampão do cálcio fosfato, testada inicialmente, as células HEK apresentaram expressão acentuada, porém com morfologia arredondada e soltas do fundo da placa de cultura, indicando que apesar da expressão, as células estavam mortas. Para contornar isso foram feitas alterações

no tempo de exposição das células HEK ao tampão cálcio fosfato, baseando em parâmetros de concentração do cálcio e do mínimo tempo de exposição necessária para se ter transfecção com expressão proteica, sem morte celular (Jordan et al., 1996). Essa padronização resultou em um tempo ótimo de duas horas de exposição no tampão cálcio fosfato para células HEK, onde foi alcançado parâmetros funcionais de transfecção, expressão de proteína e sobrevivência celular. Visto isso, todos os resultados e a metodologia padronizada para testar moduladores vegetais de NR resultou no depósito de Patente de Invenção “Análogos Vegetais de Hormônios Tireoidianos” (BR 102014 018934-3) no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

O estudo etnobotânico o qual forneceu a lista de plantas iniciais para este estudo foi elaborado no intuito de encontrar análogos do hormônio tireoidiano, ou de moléculas que modulem o seu receptor. Embora essas plantas tenham sido relacionadas a doenças tireoide, e possivelmente conter moléculas moduladoras do TR, algumas delas conseguiram ativações medianas do ER. Esse resultado corrobora com estudos que demonstram a existência de um *crosslink* entre ligantes de diferentes receptores (Ong e Tan, 2007; Fujimoto et al., 2004). O receptor do hormônio tireoidiano já mostrou ser ativado por ligantes do receptor de estrógeno, e vice-versa (Fujimoto et al., 2004). Isto explica porque extratos que foram inicialmente indicados para doenças relacionadas à regulação do TR conseguiram ativar os genes através do ER, e confirma a hipótese inicial de que isso poderia acontecer, quando escolhemos os extratos com resultado positivo em ER para serem testados com o TR. Isso mostra que o processo de *crosslink* na ativação dos receptores é bastante possível e que estudos etnobotânicos podem auxiliar indicando plantas candidatas conter ligantes ou moléculas moduladoras de receptores nucleares.

Produtos de origem natural, sejam eles microbianos, animais ou vegetais representam uma fonte quase inesgotável de estruturas moleculares que podem ser úteis para fins terapêuticos, ou como modelo para desenho químico de novas moléculas. Nossos resultados pretendem dar uma contribuição para o vasto conhecimento sobre o uso de plantas no tratamento de doenças através da regulação dos receptores nucleares. Ressaltamos também a importância fundamental da conservação da biodiversidade para manutenção da vida através da descoberta de novos fitofármacos e tratamentos para doenças ainda sem cura.

A biodiversidade do Brasil, e o conhecimento tradicional do uso das plantas medicinais,

aumentam a chance de encontrarmos tais ligantes, com base em levantamentos na comunidade. Nesse sentido ligantes vegetais de plantas indicadas em estudos etnobotânicos apresentaram uma abordagem alternativa promissora para encontrarmos moduladores genéticos de origem natural.

Os resultados gerados neste trabalho são de extrema importância e relevância dentro da linha de pesquisa com produtos naturais e receptores nucleares, pois é a primeira vez na literatura que se descreve um produto de origem natural modulador do receptor do hormônio tireoidiano.

6 Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao povo brasileiro pela perpetuação do conhecimento tradicional no campo das plantas medicinais, a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) por ceder um dos extratos usados neste trabalho além da estrutura para obtenção dos extratos e a Universidade Federal de São Paulo por gentilmente ceder toda sua estrutura para os testes *in vitro*.

7 Referências

ÅKERMAN, BJÖRN; COLE, KENNETH D. Electrophoretic capture of circular DNA in gels. **Nucleic acids**. v.23, p. 2549–2561.

AZQUETA, AMAYA; COLLINS, ANDREW R.. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch Toxicol**. v. 87, p.949–968, 2013.

CHEN, S; GAO J; HALICKA D; TRAGANOS F; DARZYNKIEWICZ. Down-regulation of androgen receptor and PSA by phytochemicals. **Int J Oncol**. v.32, n.2, p. 405-411, 2008.

CHEN, YI; YOUNG, MATTHEW A. Structure of a Thyroid Hormone Receptor DNA-Binding Domain Homodimer Bound to an Inverted Palindrome DNA Response Element.. **Mol Endocrinol**, August. vol, 24(8), p, 1650–1664, 2010.

CLINCKEMALIE, Liesbeth; VANDERSCHUEREN Dirk; BOONEN Steven; CLAESSENS Frank. The hinge region in androgen receptor control. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2012.

CUNHA LIMA ST; RODRIGUES ED; MELO T; NASCIMENTO AF; GUEDES MLS; CRUZ T; ALVES C; MEYER R, TORALLES MB. Levantamento da flora medicinal usada no tratamento de doenças metabólicas em Salvador, BA, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.10, n. 4, p.83- 89, 2008

CUNHA LIMA, S.T; RODRIGUES, E.D; ALVES, C; MERRIGAN, T.L.; MELO, T.; GUEDES, M.L.S.; NASCIMENTO, A.F.; TORALLES, M.B. The use of medicinal plants by an indigenous Pataxó community in NE Brazil. **Rev. Bras. Pl. Med**. v.14, n.1, p.84-91, 2012.

DEROO, Bonnie J.; KORACH, Kenneth S. Estrogen receptors and human disease: J. Clin. Invest. 116:561–570 2006.

EDWARDS, Dean P. The Role of Coactivators and Corepressors in the Biology and Mechanism of Action of Steroid Hormone Receptors **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. v. 5, n. 3, 2000.

FUJIMOTO, N; JINNO, N; KITAMURA S. Activation of estrogen response element dependent transcription by thyroid hormone with increase in estrogen receptor levels in a rat pituitary cell line, GH3. **Journal of Endocrinology** . v, 181, p 77–83, 2004.

GOGLIAA, FERNANDO; MORENOA, MARIA; LANNIA B, ANTONIA. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. **FEBS Letters**, v. 452, p. 115-120, 1999.

HAIDER, Neena B.; JACOBSON, Samuel G.; CIDECIYAN, Artur V.; SWIDERSKI, Ruth; STREB, Luan M.; SEARBY, Charles; BECK, Gretel; HOCKEY, Robin; HANNA, David B.; GORMAN, Susan; DUHL, David; CARMI, Rivka; BENNETT, Jean; WELEBER, Richard G.; FISHMAN, Gerald A.; WRIGHT, Alan F.; STONE, SHEFFIELD, Edwin M.; Val C.. Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. **nature genetics**.vol 24, 2000

HELSEN Christine; KERKHOF S Stefanie; CLINCKEMALIE Liesbeth; SPANS Lien; LAURENT Michaël; BOONEN Steven; VANDERSCHUEREN Dirk; CLAESSENS Frank. **Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding**. Molecular and Cellular Endocrinology. v.348, p. 411–417, 2012.

JORDAN, MARTIN; SCHALLHORN, ANNETTE; WURM, FLORIAN M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 4, 1996.
LAHLOU, MOUHSEN. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**. Vol.4, pag 17-31, 2013.

LIN, Feng-Min; CHEN, Li-Ru; LIN, En-Hau; KE, Ferng-Chun; CHEN, Hsin-Yi; TSAI, Meng-Jen; HSIAO, Pei-Wen. Compounds from *Wedelia chinensis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, vol.28, n.12, p.2521–2529, 2007.

NEUMANN E, SCHAEFER-RIDDER M, WANG Y, HOF SCHNEIDER PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO Journal**. v.1, n.7 p, 841-845, 1982.

ONG VYC; TAN BKH. Novel phytoandrogens and lipidic augmenters from *Eucommia ulmoides*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.7, n. 3, p. 1-11, 2007.

PAWLAK, Michal; LEFEBVRE, Philippe; STAELS, Bart. General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. vol. 12, p 486-504, 2012.

PASCUAL, Angel; ARANDA, ANA. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. **Biochim. Biophys. Acta**. 1830, 3908-3816, 2013

SARKAR, PRADIP K.; BISWAS, AVIJIT; RAY, ARUN K.; MARTIN, JOSEPH V. Mechanisms of L-Triiodothyronine-Induced Inhibition of Synaptosomal Na⁺-K⁺-ATPase Activity in Young Adult Rat Brain Cerebral Cortex. **Journal of Thyroid Research**, vol. 2013, pag. 9, 2013.

SCHMIDT, Barbara; RIBNICKY, David M.; POULEV, Alexander; LOGENDRA, Sithes; CEFALU, William T; RASKIN, Ilya. A natural history of botanical therapeutics **Metabolism Clinical and Experimental**. Vol. 57, Suppl 1, S3–S9, 2008.

SLADEK, FRANCES M. Nuclear Receptors as Drug Targets: New Developments in Coregulators, Orphan Receptors and Major Therapeutic Areas. **Expert Opin. Ther. Targets**. 7(5) 2003.

SEMPLE, Robert K.; CHATTERJEE, V. Krishna K.; O'RAHILLY, Stephen. PPAR γ and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 116:581–589, 2006.

WANG, XIAO-LING; KONG, FENG; SHEN, TAO; YOUNG, CHARLES YF; LOU, HONG-XIANG; YUAN, HUI-QING. Sesquiterpenoids from myrrh inhibit androgen receptor expression and function in human prostate cancer cells. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.32, p 338–344, 2011.

WANG, Thomas T.Y; SCHOENE, Norberta, W; MILNER, John A; KIM, Young, S. Broccoli-Derived Phytochemicals Indole-3-Carbinol and 3,30-Diindolylmethane Exerts Concentration-Dependent Pleiotropic Effects on Prostate Cancer Cells: Comparison With Other Cancer Preventive Phytochemicals. **Molecular Carcinogenesis** vol. 51, 244–256, 2012.

REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO

AGRA, Maria de Fátima; FREITAS, Patrícia França de; BARBOSA-FILHO, José Maria. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n.1, p. 114-140, 2007.

BAIN, David L.; HENEGHAN, Aaron F.; CONNAGHAN-JONES, Keith D.; MIURA, Michael T. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. **Annu. Rev. Physiol**, v. 69, p. 201–20, 2007.

BASSETT, J.H. DUNCAN; HARVEY, CLARE B; WILLIAMS, GRAHAM R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 213, p.1–11, 2003.

BERNAL, JUAN; MORTE, BEATRIZ. Thyroid hormone receptor activity in the absence of ligand: Physiological and development implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3893-3899, 2013.

BHASIN S; CALOF OM; STORER TW; LEE ML; MAZER, NA; JASUJA R; MONTORI VM, GAO W, DALTON JT. Drug Insight: testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v. 2, n.3, p.146-159, 2006.

BORNGRAEBER, S; BUDNY MJ; CHIELLINI; CUNHA-LIMA ST; TOGASHI M; WEBB P; BAXTER JD; SCANLAN TS; FLETTERICK RJ. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.26, p.15358-15363, 2003.

BOURGUET, William; GERMAIN, Pierre; GRONEMEYER, Hinrich. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, p. 381–388, 2000.

BRANDÃO, MGL; COSENZA, G. P; MOREIRA, R, A; MONTE-MOR, R,L,M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.3, p.408-420, 2006.

BURRIS, Thomas P; MONTROSE, Chahrzad; HOUCK, Keith A; OSBORNE, Harold E; BOCCHINFUSO, Wayne P; YADEN, Benjamin C; CHENG, Christine C; ZINK, Richard W; BARR, Robert J; HEPLER, Christopher D; KRISHNAN, Venkatesh; BULLOCK, Heather A; BURRIS, Lorri L; GALVIN, Rachelle J; BRAMLETT, Kelli; STAYROOK, Keith R. The Hypolipidemic Natural Product Guggulsterone Is a Promiscuous Steroid Receptor Ligand. **Molecular pharmacology**, v. 67, n. 3, 2005.

CARVALHO, GISAH A; RAMOS, DE HELTON E.. Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoidiano. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, n. 1, 2004.

CHEN, S; GAO J; HALICKA D; TRAGANOS F; DARZYNKIEWICZ. Down-regulation of androgen receptor and PSA by phytochemicals. **Int J Oncol**, v.32, n.2, p. 405-411, 2008.

CHEN, YI; YOUNG, MATTHEW A. Structure of a Thyroid Hormone Receptor DNA-Binding Domain Homodimer Bound to an Inverted Palindrome DNA Response Element.. **Mol Endocrinol, August**, v. 24, n. 8, p. 1650–1664, 2010.

CHEN, WEI, ROEDER, ROBERT G.. Mediatordependent nuclear receptor function.. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, p. 749– 758, 2011.

CLINCKEMALIE, Liesbeth; VANDERSCHUEREN Dirk; BOONEN Steven; CLAESSENS Frank. The hinge region in androgen receptor control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2012.

CUNHA LIMA ST; RODRIGUES ED; MELO T; NASCIMENTO AF; GUEDES MLS; CRUZ T; ALVES C; MEYER R, TORALLES MB. Levantamento da flora medicinal usada no tratamento de doenças metabólicas em Salvador, BA, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n. 4, p. 83- 89, 2008.

CUNHA LIMA ST; NGUYEN NH; TOGASHI M; APRILETTI JW; NGUYEN P; POLIKARPOV I; SCANLAN T; BAXTER JD; WEBB P. Differential Effects of TR Ligands on Hormone Dissociation Rates:Evidence for Multiple Ligand Entry/Exit Pathways. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.117, p. 125-131, 2009.

CUNHA LIMA, SUZANA T.; NGUYEN, NGOC-HA; TOGASHI, MARIE; APRILETTI, JAMES W.; NGUYEN, PHUONG; POLIKARPOV, IGOR; SCANLAN, THOMAS S.; BAXTER, JOHN D.; WEBB, PAUL. Differential effects of TR ligands on Hormone Dissociation Rates: Evidence for Multiple Ligand Entry/Exit Pathways. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 117, p. 125-131, 2009.

CUNHA LIMA, ST; RODRIGUES ED, The oligomeric state of thyroid receptor regulates hormone binding kinetics. **Journal of Endocrinology**, v. 210, p. 125-134, 2011.

EDWARDS, Dean P. The Role of Coactivators and Corepressors in the Biology and Mechanism of Action of Steroid Hormone Receptors **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 5, n. 3, 2000.

ELISABETSKY, E; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 111-120, 1996.

GAO W; BOHI CE; DALTON JT. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. **Chem Rev**, v.105, n.9, p. 3352-3370, 2005.

GARZA, Anna M. S.; KHAN, Shagufta H; KUMAR Raj. Site-Specific Phosphorylation Induces Functionally Active Conformation in the Intrinsically Disordered N-Terminal Activation Function (AF1) Domain of the Glucocorticoid Receptor. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 1, p. 220–230, 2010.

GARZA, ANNA S.; KHAN, SHAGUFTA H.; MOURE, CARMEN M.; EDWARDS, DEAN P.; KUMAR, RAJ. Binding-Folding Induced Regulation of AF1 Transactivation Domain of the Glucocorticoid Receptor by a Cofactor That Binds to Its DNA Binding Domain. **PLoS ONE**, 6(10): e25875, 2011.

GOGLIAA, FERNANDO; MORENOA, MARIA; LANNIA B, ANTONIA. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. **FEBS Letters**, v. 452, p. 115-120, 1999.

GRIMALDI A; BUISINE N; MILLER T; SHI YB; SACHS LM. Mechanisms of thyroid hormone receptor action during development: lessons from amphibian studies. **Biochim Biophys Acta**, v.1830, n. (7), p. 3882-92, 2013.

GUERRA MR; GALLO CVM; MENDONÇA GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev Bras Cancerol**, v.51, n.3, p. 227-234, 2005.

GULLO, Vincent P; MCALPINE, James; LAM, Kin S; BAKER, Dwight; PETERSEN Frank. Drug discovery from natural products. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 523–531, 2006.

HAIDER, Neena B.; JACOBSON, Samuel G.; CIDECIYAN, Artur V.; SWIDERSKI, Ruth; STREB, Luan M.; SEARBY, Charles; BECK, Gretel; HOCKEY, Robin; HANNA, David B.; GORMAN, Susan; DUHL, David; CARMİ, Rivka; BENNETT, Jean;

WELEBER, Richard G.; FISHMAN, Gerald A.; WRIGHT, Alan F.; STONE, SHEFFIELD, Edwin M.; Val C.. Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. **nature genetics**, v. 24, 2000.

HANSEN MB, NIELSEN SE, BERG K. Re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J Immunol Methods**, v. 119, p. 203-210, 1989.

HARVEY, AL. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, p. 894-901, 2008.

HELSEN Christine; KERKHOFs Stefanie; CLINCKEMALIE Liesbeth; SPANS Lien; LAURENT Michaël; BOONEN Steven; VANDERSCHUEREN Dirk; CLAESSENS Frank. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.348, p. 411–417, 2012.

HUBER BR; DESCLOZEAUX M; WEST BL; CUNHA LIMA ST; NGUYEN HT; BAXTER JD; INGRAHAM HA; FLETTERICK RJ. Thyroid Hormone Receptor Mutations Conferring Hormone Resistance and Reduced Corepressor Release Exhibit Decreased Stability in the N-Terminal Ligand-Binding Domain. **Molecular Endocrinology**, v.17, n. 1, p. 107-116, 2003.

HUBER BR; SANDLER B; WEST BL; CUNHA LIMA ST; NGUYEN HT; APRILETTI JW; BAXTER JD; FLETTERICK RJ. Two Resistance to Thyroid Hormone Mutants with Impaired Hormone Binding. **Molecular Endocrinology**, v.17, n. 4, p. 643-652, 2003.

IŞIK EMREGÜL; BECK-PECCOZ PAOLO; CAMPI IRENE; ÖZÖN ALEV; ALIKAŞIFOĞLU AYFER; GÖNÇ NAZLI; KANDEMİR NURGÜN. Thyroid hormone resistance: a novel mutation in thyroid hormone receptor beta (THRβ) gene - case report. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 55, p. 322-327, 2013.

KATRYN J. STACEY, IAN L. ROSS AND DAVID A. HUME. Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages. **Immunology and Cell Biology**. v.71, p, 75-85, 1993.

KUMAR, RAJ; MCEWAN, IAIN J.. Allosteric Modulators of Steroid Hormone Receptors: Structural Dynamics and Gene Regulation. **Endocrine Reviews**, v.33: 0000–0000, 2012.

KUROYANGI M; KEKI T; HAYASHI T; NAGASHIMA Y; KAWAHARA N; SEKITA S; SATAKE M. Antiandrogenic Triterpenoids from the Brazilian Medicinal Plant *Cordia multispicata*. **Chem. Pharm**, v.49, n.8, p. 954-957, 2001.

LAHLOU, MOUHSEN. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v..4, p. 17-31, 2013.

LAVERY, DEREK N.; MCEWAN, IAIN J.. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. **Biochem. J**, v.391, p.449–464, 2005.

LI, J. W.-H; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, p.161-165, 2009.

LILIE, EO; BERNSTEIN L; URSIN G. The role of androgens and polymorphisms in the androgen receptor in the epidemiology of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v.5, n.3, p.1-10, 2003.

LIN, Feng-Min; CHEN, Li-Ru; LIN, En-Hau; KE, Ferng-Chun; CHEN, Hsin-Yi; TSAI, Meng-Jen; HSIAO, Pei-Wen. Compounds from *Wedelia chinensis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n.12, p.2521–2529, 2007.

MCCHESENEY, JAMES D.; VENKATARAMAN, SYLESH K.; HENRI, JOHN T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015–2022, 2007.

NGUYEN NH; APRILETTI JW; CUNHA LIMA ST; WEBB P; BAXTER JD; SCANLAN TS. Rational Design and Synthesis of a Novel Thyroid Hormone Antagonist That Blocks Coactivator Recruitment. **J. Med. Chem**, v.45, p. 3310-3320, 2002.

ONG VYC; TAN BKH. Novel phytoandrogens and lipidic augmenters from *Eucommia ulmoides*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n. 3, p. 1-11, 2007.

PASCUAL, Angel; ARANDA, ANA. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1830, p. 3908-3816, 2013.

PAWLAK, Michal; LEFEBVRE, Philippe; STAELS, Bart. General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 486-504, 2012.

PIERRE GERMAIN, BART STAELS, CATHERINE DACQUET, MICHAEL SPEDDING, AND VINCENT LAUDET. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. **Pharmacol Rev**, v. 58, p. 685–704, 2006.

QUEIRES LCS; FAUVEL-LAFEVE F; TERRY S; TAILLE, de LA A; KOUYOUMDJIAN JC; CHOPIN DK; VACHEROT F; RODRIGUES LEA; CREIN M. Polyphenols purified from the brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer Research**, v.26, n.1, p. 379-387, 2006.

RATES, S.M.K., Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p 603–613, 2001.

SANDOVAL, ADRIÁN G.; MANZUR, FERNANDO J.; GÓMEZ, DORIS; GÓMEZ-A, CLAUDIO. Receptores nucleares y metabolismo de lípidos: implicaciones cardiovasculares Nuclear receptors and lipid metabolism: cardiovascular implications. **Rev Colomb Cardiol**, v.16, p. 29-34 2009.

SARKAR, PRADIP K.; BISWAS, AVIJIT; RAY, ARUN K.; MARTIN, JOSEPH V. Mechanisms of L-Triiodothyronine-Induced Inhibition of Synaptosomal Na⁺-K⁺-ATPase Activity in Young Adult Rat Brain Cerebral Cortex. **Journal of Thyroid Research**, ID 457953, p.9, 2013.

SCHMIDT, Barbara; RIBNICKY, David M.; POULEV, Alexander; LOGENDRA, Sithes; CEFALU, William T; RASKIN, Ilya. A natural history of botanical therapeutics **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 57, Suppl 1, S3–S9, 2008.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista brasileira de farmacognosia**, v 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

TRAKA M; GASPER AV; MELCHINI A; BACON JR; NEEDS PW; FROST V; CHANTRY A; JONES AME; ORTORI CA; BARRET DA; BALL RY; MILLS RD; MILTHEN RF. Broccoli Consumption Interacts with GSTM1 to Perturb Oncogenic Signalling Pathways in the Prostate. **Plos ONE** 3(7): e2568, 2008.

WAGNER RL; B. HUBER R; SHIAU AK; KELLY A; CUNHA LIMA ST; SCANLAN TS; APRILETTI JW; BAXTER JD; WEST BL; FLETTERICK RJ. Hormone Selectivity in Thyroid Hormone Receptors. **Molecular Endocrinology**, v.15, n.3, p. 398-410, 2001.

WEATHERMAN, Ross V.; FLETTERICK, Robert J.; SCANLAN Thomas S. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. **Annu. Rev. Biochem**, v .68, p. 559–581, 1999.

WEBB P; NGUYEN NH; CHIELLINI G; YOSHIHARA HAI; CUNHA LIMA ST; APRILETTI JW; RIBEIRO RCJ; MARIMUTHU A; WEST BL; GOEDER P; MELLSTROM K; NILSSON S; KUSHNER PJ; FLETTERICK RJ; SCANLAN TS; BAXTER JD. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 83, p. 59–73, 2003.

ZHAO, YANGBING; ZHENG, ZHILI; COHEN, CYRILLE J; GATTINONI, LUCA; PALMER, DOUGLAS C; RESTIFO NICHOLAS P; ROSENBERG, STEVEN A; MORGAN, RICHARD A. High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation. **Molecular therapy**. v. 13, n. 1, 2006.

ANÁLOGOS VEGETAIS DE HORMÔNIO TIREOIDIANO

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente Patente de Invenção (PI) é resultado do uso de ferramentas da biologia molecular e da farmacogenômica para testar a atividade de extratos vegetais como análogos agonistas do receptor do hormônio tireoideano. O receptor de hormônio tireoideano (TR) faz parte de uma superfamília de receptores intracelulares e são fatores de transcrição estando associados ao controle da atividade de diferentes

10 genes e patologias, como a resistência hormonal, hipertireoidismo, hipotireoidismo, diabetes e obesidade. A atividade transcricional do receptor do TR pode ser modulada positivamente ou negativamente de acordo com seus ligantes. Ligantes moduladores dos receptores, tanto sintéticos quanto naturais, têm sido estudados e alguns deles foram elaborados a partir de plantas utilizadas como fitofármacos ou

15 alimento humano e animal. Após testar o extrato de espécies brasileiras, selecionadas previamente a partir de levantamento etnobotânico com a população de Salvador-BA (CUNHA LIMA, 2008), foram descobertas, por transfecção transiente, duas plantas com capacidade de modular positivamente a atividade do receptor do hormônio tireoideano: *Cajanus sp* (feijão-andu ou feijão-guandú); e *Stillingia saxatilis*

20 Mull.Arg em células humanas (HEK).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os receptores nucleares (RN) são proteínas que desenvolvem um papel fundamental na expressão gênica atuando como fatores de transcrição mediante

25 ligação com diversas moléculas ligantes, atuando em diversos aspectos da sinalização celular e fisiologia humana. Essas proteínas compartilham domínios estruturais que são funcionalmente e estruturalmente relacionados, como os domínios de ligação ao DNA (DBD) que são altamente conservados entre os diferentes receptores, o domínio de ligação ao ligante (LBD), além de outras regiões de

30 seqüências de aminoácidos com pouca correlação entre os receptores como é a região N-terminal e região da dobradiça (H) (KUMAR & MCEWAN, 2012). Receptores tireoideanos estão disseminados por diversos órgãos no corpo humano e desenvolvem

uma vasta gama de funções através da regulação gênica, as quais em nível celular passam desde diferenciação à proliferação. O modo como os receptores nucleares exercem sua função é dependente do contexto celular no qual se encontram (PASCUAL & ARANDA 2013). O mecanismo clássico de ação dos hormônios 5 tireoidianos, ao qual se atribui seus efeitos no desenvolvimento, crescimento e metabolismo, é dado por meio da ligação dos hormônios tireoidianos aos receptores nucleares e consequente regulação gênica. Os principais hormônios produzidos pela glândula tireoide são a L-tiroxina (T4) e L-triiodotironina (T3), esses por sua vez exercem funções fundamentais para homeostase do organismo participando 10 ativamente da regulação de processos metabólicos, no momento em que ligados aos receptores do hormônio tireoidiano (TR) estimulam a expressão de genes específicos, ou reprimem a expressão desses genes pela dissociação hormonal do receptor (GOGLIA et al 1999; SARKAR et al 2013).

Os RN podem atuar como homodímeros, heterodímeros ou monômeros 15 ligando-se a sequências específicas em genes alvos conhecidas como elementos de resposta ao hormônio (HRE), que estão presentes em regiões acentuadoras e auxiliam o recrutamento gradual de co-reguladores transcricionais como os co-ativadores, que incluem modificadores de cromatina tais como remodeladores de cromatina ATP-dependente, acetilases de histonas e metil-transferases, e os co- 20 repressores que se associam com os NR quando estes não estão associados com o seu ligante e recrutam complexos desatilases de histonas para regiões promotoras de genes alvos reprimindo assim a expressão gênica (CHEN & ROEDER, 2011).

Os receptores do hormônio tireoidiano (TR) atuam numa série de funções durante desenvolvimento dos eucariontes e estão presentes em duas isoformas: o 25 TR α e o TR β , sendo as suas sequências de aminoácidos bastante conservadas em diferentes grupos de organismo tais como anfíbios, mamíferos, peixes e aves (GRIMALDI et al, 2012).

Além da clássica ação dos hormônios através dos receptores nucleares, é sabido que estes possuem uma segunda via para exercer seus efeitos, ao qual é 30 denominada via não clássica ou não genômica, na qual os receptores em sua forma sem ligante, ou “apo” exercem um papel repressor da expressão gênica através da ligação com co-repressores e possivelmente atuando no eixo tireoidiano (TR-

hipotálamo-hipófise) e do desenvolvimento (BASSET et al 2003;BERNAL & MORTE 2013).

O hormônio T3 se associa ao TR numa região específica dentro do domínio LBD que é conhecida como LBC (Ligand Binding Cavity), ou “”bolso do receptor”.

5 O processo clássico para associação e dissociação dos ligantes é através da alfa hélice 12 que forma uma espécie de “portão” molecular na entrada do LBC. No entanto existem outras vias supostas para dissociação dos ligantes (CUNHA LIMA et al 2009).

Visto que ativação desses receptores é dependente de ligante, a indústria
10 farmacêutica vem trabalhando sobre as propriedades dos receptores no intuito de modular características fisiológicas por eles controladas, pelo uso de moléculas que ativam ou desativam os receptores. Apesar da eficiente produção de moléculas sintéticas (agonistas ou antagonistas), outras derivadas de produtos naturais (plantas e animais) também apresentam atividade moduladora, o que pode ser uma vantagem
15 para o Brasil, devido a sua ampla biodiversidade. Deve-se ressaltar que não apenas as plantas terrestres têm componentes com capacidade modulatória dos RN, mas também àquelas do ambiente marinho. Uma revisão recente (YANG, C. et al. 2014) mostra a importância dos ligantes vegetais a nível farmacológico, dando uma ênfase em compostos extraídos de produtos marinhos. O campo para bioprospecção de
20 ligantes de origem natural é amplo e extremamente promissor para a indústria farmacológica.

TÉCNICA RELACIONADA

25 A literatura técnica especializada revela acima de 1000 documentos que utilizam produtos relacionados à invenção, como por exemplo, visto nos documentos US2013251631 (A1), JP2012144544 (A), MX2011011028 (A) e MX2011004347. Todos os produtos são análogos sintéticos do hormônio tireoidiano. Nenhum deles é extraído de planta e nem de nenhum outro produto natural. Outros três documentos
30 encontrados são de análogos de hormônio tireoidiano produzidos por modificação genética de plantas, como visto em US2006059588 (A1) e US2006059588 (A1) ou um suplemento alimentar para deficiência em iodo RU2271726 (C1). Os ligantes

vegetais de RT ainda não foram patenteados e possuem grande importância farmacológica. A busca foi realizada para três outros receptores nucleares alvos de doenças importantes (de glicocorticoide, mineralocorticoide e ácido retinóico) e nenhum ligante vegetal destes RN foi encontrado, demonstrando o potencial farmacológico e de bioprospecção destas moléculas. Em 2011 depositamos um pedido de patente no INPI (0221106730326), referente a análogos do estrógeno (hormônio feminino) em plantas. O campo de descobertas de novos fitofármacos moduladores ainda é bem grande, já que estes fatores somam aproximadamente 100 proteínas, alvo de inúmeras doenças na espécie humana.

10

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O levantamento etnobotânico prévio de plantas usadas pela população em patologias associadas ao hormônio tireoidiano serviu como base para a escolha de 15 candidatos a fármacos. As plantas citadas nas entrevistas foram coletadas, classificadas e espécies testemunhas (*voucher species*) depositadas no ALCB-IBIO-UFBA (CUNHA LIMA et al, 2008). Extratos etanólicos das plantas citadas foram preparados na concentração de 1g/ml usando etanol, metanol ou DMSO a 80% como veículo.

20 Plasmídeos CMV contendo a sequência *full lenght* do receptor de hormônio tireoidiano e genes da luciferase foram inseridos em bactérias e amplificados por cultivo, a 37° C, em meio LB líquido. Após purificação, o DNA plasmidial foi inserido em células humanas através de ensaios de transfecção transiente, também conhecido como ensaio gene-repórter. Foram usados plasmídeos pCMV contendo o 25 DNA do receptor de hormônio tireoidiano e o DNA do promotor associado ao gene repórter, o qual emitiu fluorescência em caso de ativação. O plasmídeo pRL-TK contendo o gene renila também foi usado como controle da reação. A leitura de absorbância foi feita em luminômetro. Os dados obtidos foram plotados no programa *GraphPad Prism* para determinação da curva dose-resposta e dos melhores 30 extratos com indicação fitotireoidogênica.

Após testar o extrato de espécies selecionadas a partir de levantamento etnobotânico com a população de Salvador-BA, foram descobertas duas plantas com

capacidade de modular positivamente a atividade do receptor de hormônio tireoidiano: *Cajanus sp* (feijão-andu ou feijão-guandú) e *Stillingia saxatilis* Mull.Arg que se tornam desta forma, promissores candidatos à análogos vegetais do hormônio tireoidiano humano, com grande importância farmacológica já que este receptor está associado ao controle do metabolismo e do desenvolvimento. A primeira, em dosagens e com respostas diferentes também foi capaz de modular o receptor de estrógeno (RE), conforme demonstrado em nossa patente anterior, citada acima. O motivo deste fato é que alguns receptores nucleares, como é o caso do RE e do RT, e também do RA, respondem a alguns ligantes em comum.

10

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Os dois gráficos são referentes à análise da resposta dos extratos metanólicos das plantas *Cajanus cajan* (L.) Nillsp e *Stillingia saxatilis* Mull.Arg obtidas por secagem e rotaevaporação. Os respectivos extratos foram usados em ensaios de transfecção transiente pela técnica do cálcio fosfato em células humanas HEK, porém deve ser entendido que o processo não é exclusivo nem limitado a estes extratos, podendo ser estendido a outros gêneros e espécies de plantas.

No gráfico 1 o eixo Y mostra a porcentagem de ativação, sendo o hormônio tireoidiano sintético T3 o controle positivo (100%). O eixo X mostra as concentrações dos extratos utilizadas nos testes. A eficiência de ativação do receptor tireoidiano pelas respectivas concentrações dos extratos usadas nos testes são medidas indiretas da ativação do receptor através da atividade da enzima luciferase. A planta *Cajanus cajan* (L.), obteve uma ativação de luciferase de 63% quando comparado ao controle positivo. O gráfico 2 mostra a ativação da planta *Stillingia saxatilis* Mull.Arg, a qual obteve uma ativação máxima de 53% quando comparada com o controle positivo.

30

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Para que o processo da invenção possa ser mais bem compreendido e avaliado, sua descrição detalhada será feita a seguir.

A invenção consiste na obtenção de extratos metanólicos preparados com as folhas do *C. Cajan*, e as partes aéreas da *S. saxatilis* através de rotaevaporação. O material vegetal deve ser secado em estufa à 50° C, moído em moinho de faca, e deixado em solução com hexano por uma semana. Ao final de cada semana, este 5 material deve ser rotaevaporado e as substâncias retiradas pelo hexano (extrato hexânico) armazenadas a 4°C. Esse procedimento deve ser repetido três vezes, com a retirada em seguida de todo hexano contido no material e então o material vegetal deve ser embebido em metanol e repetido a operação de rotaevaporação a cada semana.

Os plasmídeos e receptores necessários devem ser inseridos em bactérias 10 DH5α e amplificados por cultivo bacteriano em meio LB líquido, a 37 °C, seguindo protocolo padrão de transformação e crescimento bacteriano. A purificação do DNA plasmidial deve ser feita com o uso de kits de extração de DNA, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante.

Por fim devem ser realizados ensaios de transfecção transiente usando células 15 humanas HEK. Estas células devem ser transfectadas com a utilização da técnica de cálcio fosfato, usando plasmídeos CMV contendo o DNA do receptor do hormônio tireoidiano, plasmídeos CMV contendo o elemento responsivo ao TR, associado à sequência de DNA do gene repórter, o qual emite fluorescência em caso de ativação. O plasmídeos pRL-TK contendo o gene *renila* também devem ser transfectados para 20 atuar como controle da reação. A leitura de absorbância deve ser feita em luminômetro. Os dados obtidos devem ser plotados no programa GraphPad Prism para determinação da curva-dose resposta e dos melhores extratos com indicação fitotireogênica.

REIVINDICAÇÕES

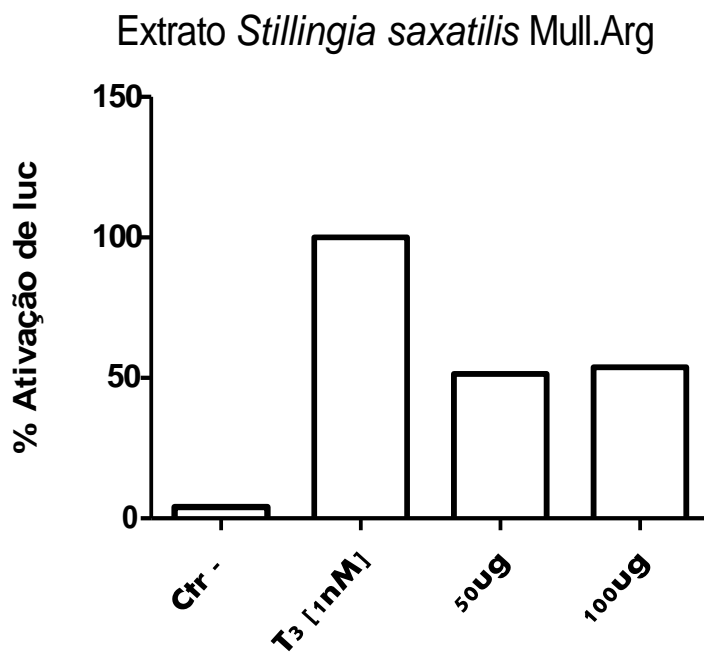
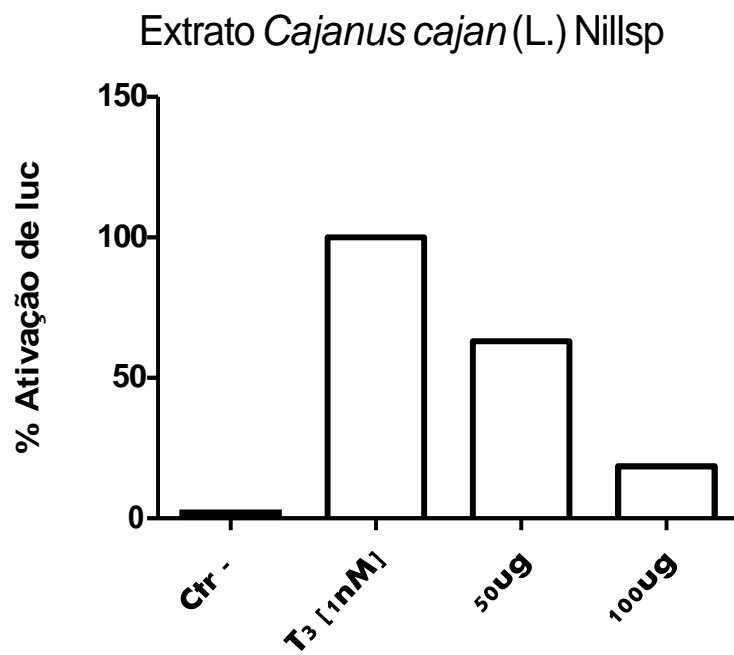
1. **ANÁLOGOS VEGETAIS DE HORMÔNIO TIREOIDIANO caracterizado por** utilizar ensaios de gene-reporter para testar *in vitro* a capacidade moduladora de extratos vegetais de plantas indicadas como análogas de hormônio tireoideano por levantamento etnobotânico.
2. **ANÁLOGOS VEGETAIS DE HORMÔNIO TIREOIDIANO** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** produção de extratos vegetais de duas espécies da flora brasileira indicadas como portadoras de compostos tireoideogênicos: *Cajanus cajan* (L.) Nillsp. (feijão-guandú) e *Stillingia saxatilis* Mull.Arg preparados com a parte vegetal indicada em levantamento e através de rotaevaporação.
3. **ANÁLOGOS VEGETAIS DE HORMÔNIO TIREOIDIANO** de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo** material vegetal ser seco em estufa à 50° C em variação de 30° C para mais ou para menos, moído em moinho de faca, e deixado em solução com hexano por uma semana, rotaevaporado e as substâncias de interesse retiradas pelo hexano (extrato hexânico).
4. **ANÁLOGOS VEGETAIS DE HORMÔNIO TIREOIDIANO** de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado pela** produção de extratos vegetais sujeitos à ensaios de transfecção transiente em células humanas HEK utilizando a técnica de cálcio fosfato usando plasmídeos do tipo CMV e pRL-TK , construídos com os insertos de TRbeta e Renila, inseridos em bactérias *E. coli* e amplificados por cultivo bacteriano em meio LB líquido após purificação do DNA plasmidial.
5. **ANÁLOGOS VEGETAIS DE HORMÔNIO TIREOIDIANO** de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado pela** produção de extratos vegetais que possam

causar resposta positiva de modulação dos genes ligados ao receptor de hormônio tireoidiano.

6. ANÁLOGOS VEGETAIS DE HORMÔNIO TIREOIDIANO de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pela produção de extratos vegetais com característica de fitofármacos no tratamento de doenças associadas à deficiência na síntese de hormônio tireoidiano ou baixa afinidade do hormônio pelo receptor, como o hipotireoidismo, ou ainda no caso de remoção parcial ou total da glândula tireoide, com consequente necessidade de reposição hormonal.

DESENHOS

Gráficos dos extratos vegetais



RESUMO

ANÁLOGOS VEGETAIS DE HORMÔNIO TIREOIDIANO

5 A presente invenção trata da indicação de extratos vegetais capazes de induzir a atividade de genes controlados pelo receptor de hormônio tireoideano (RT), funcionando como um análogo do T3. As duas espécies portadoras de compostos tireoidogênicos são: *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (feijão-guandú) e *Stillingia saxatilis* Mull.Arg. O análogo sintético de hormônio tireoideano usado no tratamento da deficiência hormonal 10 e no hipotireoidismo causa taquicardia e possíveis cardiopatias como efeitos colaterais (ZUO, *et al.* 2009; TUCKER, R.G., 1962). Ensaio de transfeção transiente foram utilizados para testar análogos sintéticos de hormônios tireoideanos em cultura de células humanas (HEK), como forma de selecionar extratos vegetais com capacidade controlar o RT. O DNA do receptor e do gene repórter são clonados em plasmídeos e 15 incorporados à célula humana HEK, e de forma transiente suas proteínas passam a ser expressas. Os resultados são avaliados por luminescência e comparados com o controle (T3 sintético). O TR é apenas um, dentre mais de 100 RNs, assim sendo, o potencial farmacológico destes ligantes é significativo, e pode ser avaliado pelo número de indústrias de biotecnologia existentes nos países de primeiro mundo que visam o 20 estudo exclusivo de receptores nucleares e moduladores.



**200 - Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade,
Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do
PCT**

Número do Processo: BR 10 2014 018934 3

Dados do Requerente

Nome: Universidade Federal da Bahia

CPF/CNPJ/Número INPI: 15180714000104

Endereço: Rua Augusto Viana s/n,

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40-110060

Pais: BR

Natureza Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

e-mail: npi@ufba.br

Dados do Procurador/Escritório

Procurador:

Nome:

CPF:

e-mail:

Nº API:

Nº OAB:

UF:

Escritório:

Nome:

CNPJ:



DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: Luã Tainã Costa Reis

6.2 Qualificação: Mestre

6.3 CPF: 043.078.255-19

6.4 Endereço Completo: R Barão de Geremoabo, 147, Inst Bio, UFBA, Ondina, SSA-BA

6.5 CEP: 40170-290

6.6 Telefone: 71 9312-7657

6.7 FAX:

6.8 E-mail: lua.taina@hotmail.com

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	06
<input type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	02
<input type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	01
<input type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	01
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar)	

12. Total de folhas anexadas: 11 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

SALVADOR, 30 DE JULHO DE 2014

Local e Data

Assinatura e Carimbo

Arcele Embiruçu de Souza
Reitor de Pesquisa, Criação e Inovação
da UFBA

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Suzana Telles de Cunha Lima

6.2 Qualificação: Doutor

6.3 CPF: 132.055.688-42

6.4 Endereço Completo: Rua Barão de Geremoabo, 147, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia Molecular Carmen Lemos, Universidade Federal de Bahia - Campus de Ondina, Salvador-BA.

6.5 CEP: 40170-290

6.6 Telefone: 71 8793-8847

6.7 Fax:

6.8 E-Mail: stcuhalima@ufba.br

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Magnus Regios Dias da Silva

6.2 Qualificação: Doutor

6.3 CPF: 634.998.784-53

6.4 Endereço Completo: Rua Professor Murtinho, 45. Vila Mariana, São Paulo-SP.

6.5 CEP: 04019-080

6.6 Telefone: 11 99325-5161

6.7 Fax: 11 5084-5231

6.8 E-Mail: mrdsilva@unifesp.br

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Eudes da Silva Velozo

6.2 Qualificação: Doutor

6.3 CPF: 516.869.707-06

6.4 Endereço Completo: Rua Barão de Geremoabo, 147, Instituto de Biologia, Laboratório de Biologia Molecular Carmen Lemos, Universidade Federal de Bahia - Campus de Ondina, Salvador-BA.

6.5 CEP: 40170-290

6.6 Telefone: 71 3283-6930

6.7 Fax:

6.8 E-Mail: euvelozo@ufba.br

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Edson Delgado Rodrigues

6.2 Qualificação: Doutor

6.3 CPF: 066.506.638-40

6.4 Endereço Completo: Rua Silveira Martins, 255, Cabula, Salvador-BA.

6.5 CEP: 41150-000

6.6 Telefone: 71 8793-8848

6.7 Fax:

6.8 E-Mail: edr1965@hotmail.com

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Silvia Lima Costa

6.2 Qualificação: Doutor

6.3 CPF: 405.898.115-68

6.4 Endereço Completo: Av. Oceânica 3375 Condomínio Vila do mar Ed. Escuna ap. 103,
Ondina, Salvador-BA.

6.5 CEP: 40170-010

6.6 Telefone: 71

6.7 Fax:

6.8 E-Mail: costasil@gmail.com / costasl@ufba.br