



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

André Miguel Martins da Cruz

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Doutora Ana Isabel de Jesus Martinho
Coorientador: Professora Doutora Maria Eugénia Gallardo Alba

Covilhã, outubro de 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar à minha orientadora Dr^a. Ana Martinho por todo o empenho, dedicação, apoio e ajuda essenciais para a realização deste trabalho ao longo do ano.

À minha coorientadora Professora Dr^a. Eugénia Gallardo pelo apoio que me deu e a preocupação que demonstrou ao longo do trabalho.

À professora Dr^a. Luiza Granadeiro pelo material que disponibilizou.

Ao professor Dr. Cláudio Maia pela gentileza de ter cedido alíquotas do primer GAPDH.

À Desertuna - Tuna Académica da Universidade da Beira Interior que me marcou bastante ao longo destes anos proporcionando momentos inesquecíveis.

A todos os meus amigos com quais vivi e partilhei momentos deste percurso académico e que me marcaram ao longo destes anos.

À minha namorada, Joana, pela paciência, apoio e preocupação que teve comigo ao longo dos anos.

Aos pais da Joana, Carlos e Gabriela, por me terem acolhido de forma amável na reta final deste trabalho.

Ao meu irmão que sempre acreditou em mim e me apoiou.

Por último mas mais importante, aos meus pais por terem sempre acreditado nas minhas capacidades, por me terem dado esta oportunidade e por todo o suporte, apoio, paciência, entre muitas outras, ao longo do meu percurso académico.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Resumo | vii |
| <i>Abstract</i> | ix |
| Índice de Figuras | xi |
| Índice de Tabelas | xiii |
| Lista de Acrónimos | xv |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Novas substâncias psicoativas | 1 |
| 1.2. As drogas em Portugal | 3 |
| 1.3. <i>Salvia divinorum</i> | 5 |
| 1.3.1. Caraterização geral | 5 |
| 1.4. Salvinorina A..... | 12 |
| 1.4.1. Contextualização | 12 |
| 1.4.2. Caraterísticas físico-químicas | 12 |
| 1.4.3. Farmacocinética | 13 |
| 1.4.4. Mecanismo de Ação | 14 |
| 1.4.5. Métodos de deteção..... | 16 |
| 1.4.6. Potenciais efeitos terapêuticos | 17 |
| 1.5. Fígado..... | 20 |
| 1.6. Proteínas Hepáticas | 21 |
| 1.6.1. Citocromo C | 21 |
| 1.6.2. Citocromos P450 | 22 |
| 1.6.3. Apolipoproteína B100..... | 23 |
| 1.6.4. Carboxilesterase 1 | 23 |
| 1.6.5. Glucuronosiltransferase 1A1 | 24 |
| 2. Objetivos | 25 |
| 3. Materiais e métodos | 27 |
| 3.1. Compostos, soluções e meios de cultura | 27 |
| 3.2. Equipamentos | 28 |
| 3.3. Linhas Celulares..... | 28 |
| 3.3.1. Hep G2..... | 28 |

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| 3.3.2. | WRL-68 | 28 |
| 3.4. | Culturas celulares | 29 |
| 3.4.1. | Caraterização e preparação dos meios de cultura | 29 |
| 3.4.2. | Descongelamento e contagem de células | 30 |
| 3.4.3. | Tripsinização | 30 |
| 3.4.4. | Criopreservação | 31 |
| 3.5. | Incubação das células com o composto..... | 31 |
| 3.5.1. | Preparação das soluções de salvinorina A..... | 31 |
| 3.5.2. | Incubação | 32 |
| 3.6. | Ensaio MTT..... | 32 |
| 3.6.1. | Fundamento teórico | 32 |
| 3.6.2. | Protocolo experimental | 32 |
| 3.7. | RNA total..... | 33 |
| 3.7.1. | Extração de RNA total | 33 |
| 3.7.2. | Quantificação do RNA total..... | 33 |
| 3.8. | Síntese de cDNA | 34 |
| 3.9. | PCR em tempo real..... | 34 |
| 3.9. | Tratamento Estatístico | 36 |
| 4. | Resultados e Discussão | 39 |
| 4.1. | Avaliação da citotoxicidade da Salvinorina A | 39 |
| 4.2. | Avaliação da expressão de genes | 42 |
| 4.3. | Comparação da expressão de genes nas linhas celulares estudadas | 46 |
| 5. | Conclusões e Perspetivas futuras | 51 |
| 6. | Referências | 53 |
| Anexos..... | | 63 |
| Anexo I - | Otimização de condições para o PCR em tempo real | 63 |
| Anexo II - | Artigo de revisão submetido para a Phytochemistry: A unique natural selective Kappa-opioid receptor agonist, Salvinorin A, and its roles in human therapeutics..... | 69 |
| Anexo III - | Artigo original submetido para a Life Sciences: In vitro effects of salvinorin A in mRNA expression in hepatic cell lines | 89 |

Resumo

As novas substâncias psicoativas (NPS) são, segundo a Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (EMCDDA), todo e qualquer novo estupefaciente ou nova droga psicotrópica na sua forma pura, ou por preparar, que não é controlada pela Convenção Única das Nações Unidas de 1961 sobre os estupefacientes nem pela Convenção das Nações Unidas de 1971, mas que possa representar uma ameaça para a saúde pública comparativamente às substâncias listadas nessas convenções.

Pelo seu crescente consumo a nível mundial e elevado desconhecimento do seus efeitos no organismo, as NPS têm-se tornado cada vez mais uma questão preocupante e, em 2012, foram adotadas medidas preventivas em Portugal relativamente às NPS, sendo que uma das substâncias que passou a integrar esta lista foi a *Salvia divinorum* (*S. divinorum*) e o seu componente bioativo, a salvinorina A (SA).

A *S. divinorum* é uma planta que apresenta propriedades alucinogénias a qual, até meados dos anos 60, era utilizada unicamente pelos Mazatecas (região de Oaxaca, México). A substância nela presente que lhe confere estas propriedades, e que, por isso, tem despertado um grande interesse junto da comunidade científica, é o diterpeno neoclerodano SA. A SA é distinta de todos os outros alucinogénios conhecidos por possuir um mecanismo de ação único, é um agonista seletivo dos recetores *kappa* opióides (KOR).

Apesar do alvo principal da *S. divinorum*, e da SA, ser o sistema nervoso central (SNC), até a data, ainda não foram pesquisados os seus potenciais efeitos a nível periférico, em particular a nível hepático, o órgão responsável pelo metabolismo de grande parte de compostos endógenos e xenobióticos.

Assim, com este estudo pretendeu-se determinar *in vitro* a citotoxicidade e analisar a expressão relativa de certos genes relevantes no organismo resultantes da incubação de células hepáticas (Hep G2 e WRL-68) com várias concentrações de SA durante vários períodos de tempo. Os genes estudados foram: apolipoproteína B100 (Apo B100); carboxilesterase 1 (Ces 1); citocromo C (Cit. C); citocromo P450 1A2 (CYP450 1A2); citocromo P450 2D6 (CYP450 2D6); citocromo P450 3A4; glucuronosiltransferase 1A1 (UGT 1A1).

Os resultados obtidos mostraram que, de modo geral, 50 µM de SA são citotóxicos para ambas as linhas celulares, sendo que 10 µM apenas mostraram diminuir a viabilidade celular das células Hep G2 após 72 h de incubação indicando que, aparentemente, as células Hep G2 são mais sensíveis à SA, comparando com as WRL-68. Pelo contrário, 0,1 e 1 µM não promoveram qualquer alteração na viabilidade celular relativa em ambas as linhas celulares.

Relativamente ao efeito da exposição de células Hep G2 e WRL-68 a 1 µM de SA durante vários períodos de incubação (12, 24 e 72 h) verificou-se que, no geral, a SA tem impactos em termos de expressão relativa do mRNA de vários genes, de modo dependente quer do tempo de incubação quer da linha celular. Além disso, não foi detetada qualquer expressão do gene Ces 1 nas células WRL-68, indicando que o mesmo não é expresso nesta linha celular.

Em suma, a SA aparenta ter um perfil toxicológico seguro porém em termos de regulação da expressão de genes importa salientar que, de um modo geral, pode exercer efeitos positivos ou negativos, consoante o gene em análise, o tempo de incubação com o composto e o tipo celular. Assim, e por se tratar do primeiro estudo que avaliou o potencial papel da SA na expressão hepática de certos genes, são necessárias investigações futuras para confirmar que os efeitos apresentados neste estudo são observados *in vivo* e diretamente devidos ao consumo de SA.

Palavras-Chave:

Novas substâncias psicoativas; *Salvia divinorum*; Salvinorina A; Células hepáticas; Citotoxicidade; Expressão génica.

Abstract

According to European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), the new psychoactive substances (NPS) are any new narcotic or psychotropic drug, in its pure form, or in preparation, that is uncontrolled by the United Nations Drug Convention of 1961 or 1971, but which may represent a public health threat comparable to that posed by substances listed in these conventions.

As its consumption is growing worldwide and its effects in organism still largely unknown, NPS had become increasingly a matter of concern and, in 2012, Portugal adopted some preventive actions regarding NPS, and included both the whole plant and its main bioactive compound, salvinorin A (SA), in the list of NPS.

S. divinorum is a plant with hallucinogenic properties that, till the mid-60's, was used only by Mazatecas (Oaxaca region, Mexico). The responsible substance for its hallucinogenic properties is SA, which is a neoclerodane diterpene different from the others hallucinogenic substances known, as it presents a unique mechanism of action. In fact, SA is a selective agonist of *kappa* opioid receptors (KOR).

Despite the fact that the main target of *S. divinorum*, and SA, is the central nervous system, to date, there are no studies assessing its putative peripheral effects, in particular in the liver, the main responsible organ for the metabolism of several endogenous substances and xenobiotics.

With this study we intended to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and to analyze the relative gene expression of certain genes relevant to organism caused by the exposure of hepatic cells (Hep G2 and WRL-68) to different concentrations of SA during various periods of time. The genes included in this study were: apolipoprotein B100 (Apo B100), carboxylesterase 1 (Ces 1), cytochrome C (Cyt C), cytochrome P450 1A2 (CYP450 1A2), cytochrome P450 2D6 (CYP450 2D6), cytochrome P450 3A4 and glucuronosyltransferase 1A1 (UGT 1A1).

Overall, data obtained revealed that 50 μM of SA is cytotoxic for both cell lines, while 10 μM only promoted a decrease in the cellular viability in Hep G2 cells after a 72 h incubation. Thus, it seems that, apparently, Hep G2 cells are more sensitive to SA, comparing with WRL-68. Instead, 0,1 and 1 μM did not promoted any alteration in the relative cellular viability in both cell lines.

Regarding the effects of 1 μM SA exposure in Hep G2 and WRL-68 at during various periods of time (12, 24 and 72 h) results showed that, overall, SA has a significant impact in the mRNA relative expression of various genes, depending on the time of incubation, concentration and the cell line. Besides that, we also found that Ces 1 was not detected in WRL-68 cells pointing out that it is not expressed in this cell line.

SA revealed to have a safe toxicological profile yet, the effects of SA in the regulation of gene expression are important to highlight as they could exert positive or negative effects depending in the gene of study, time of exposure and cell line.

Finally, because this is the first study that shows the SA potential effects in the liver, further research is needed to confirm if that they are directly related to SA consumption. Thus, a new research line raised and future studies should be conducted in order to achieve the *in vitro* protein expression of the genes and to confirm these findings in *in vivo* studies (rats).

Keywords:

New psychoactive substances; *Salvia divinorum*; Salvinorin A; Hepatic cells; Cytotoxicity; Gene expression.

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Salvia divinorum</i> (retirado de (EMCDDA, 2015b))..... | 6 |
| Figura 2. Estrutura molecular da Salvinorina A (retirado de (Hanson, 2010))..... | 13 |
| Figura 3. Gráfico da viabilidade celular relativa (%) das células Hep G2. Os valores apresentados correspondem à média da percentagem nas experiências realizadas \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05(*)$ | 40 |
| Figura 4. Gráfico da viabilidade celular relativa (%) das células WRL-68. Os valores apresentados correspondem à média da percentagem nas experiências realizadas \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05(*)$ | 41 |
| Figura 5. Gráfico da expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas células Hep G2. Os valores apresentados correspondem à média da expressão relativa \pm desvio-padrão após a incubação com 0 e 1 μM de SA durante 12, 24, 72 h e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05(*)$ | 43 |
| Figura 6. Gráfico da expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas células WRL-68. Os valores apresentados correspondem à média da expressão relativa \pm desvio-padrão após a incubação com 0 e 1 μM de SA durante 12, 24, 72 h e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05(*)$ | 45 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Substâncias isoladas em <i>S. divinorum</i> | 7 |
| Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> usados no PCR em tempo real. | 35 |
| Tabela 3. Condições de reação usadas no PCR em tempo real para cada gene (Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, Cit. C, GAPDH and UGT 1A1) em cada uma das linhas celulares (Hep G2 e WRL-68). | 35 |
| Tabela 4. Condições de amplificação usadas no PCR em tempo real para cada gene (Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, Cit. C, GAPDH and UGT 1A1) em cada uma das linhas celulares (Hep G2 e WRL-68). | 36 |
| Tabela 5. Viabilidade celular relativa (%) das células Hep G2 após incubação com 0, 0,1, 1, 10 e 50 μM de SA durante 12, 24, 36, 48 e 72 h. Os valores apresentados correspondem à média da percentagem nas experiências realizadas \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*). | 39 |
| Tabela 6. Viabilidade celular relativa (%) das células WRL-68 após incubação com 0, 0,1, 1, 10 e 50 μM de SA durante 12, 24, 36, 48 e 72 h. Os valores apresentados correspondem à média da percentagem nas experiências realizadas \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*). | 41 |
| Tabela 7. Expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas células Hep G2. Os valores apresentados correspondem à média da expressão relativa \pm desvio-padrão após a incubação com 0 e 1 μM de SA durante 12, 24, 72 h e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*). | 43 |
| Tabela 8. Expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas células WRL-68. Os valores apresentados correspondem à média da expressão relativa \pm desvio-padrão após a incubação com 0 e 1 μM de SA durante 12, 24, 72 h e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*). | 45 |
| Tabela 9. Resumo da expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas linhas celulares Hep G2 e WRL-68 após incubação com 1 μM de SA durante 12, 24 e 72 h. | 47 |

Lista de Acrónimos

- % CV - Viabilidade celular relativa em percentagem
- Apo B - Apolipoproteína B
- Apo B100 - Apolipoproteína B100
- CB₁ - Recetores canabinóides 1
- Ces - Carboxilesterases
- Ces 1 - Carboxilesterases 1
- Cit. C - Citocromo C
- CYP 1A2 - Citocromo P450 isoforma 1A2
- CYP 2D6 - Citocromo P450 isoforma 2D6
- CYP 3A4 - Citocromo P450 isoforma 3A4
- CYP450 - Citocromo P450
- DEPC - Dicarbonato de dietila
- DMEM-C - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* completo
- DMEM-I - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* incompleto
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DTT - Ditioneitol
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- EMA - Agência Europeia de Medicamentos
- EMCDDA - Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência
- FBS - Soro fetal bovino
- GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- HCl - Ácido clorídrico
- Hep G2 - Linha celular derivada de adenocarcinoma hepático humano
- KOR - Recetores *kappa* opióide
- LDL - Lipoproteína de baixa densidade
- LSD - Dietilamida do ácido lisérgico
- MDMA - 3,4-metilenodioximetanfetamina
- MEPS - Microextração por adsorvente empacotado
- mRNA - RNA mensageiro
- MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
- NAc - *Nucleous accumbens*
- NPS - Novas substâncias psicoativas
- PBS - Tampão fosfato salino
- RNA - Ácido ribonucleico
- Rpm - Rotações por minuto

S. divinorum - *Salvia divinorum*

SA - Salvinorina A

SB - Salvinorina B

SNC - Sistema nervoso central

TAE - Tampão Tris, acetato e EDTA

THC - Tetra-hidrocanabinol

UE - União Europeia

UGT 1A1 - Glucuronosiltransferase 1A1

UGT 2B7 - Glucuronosiltransferase 2B7

UGTs - Glucuronosiltransferases

vLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

WRL-68 - Linha celular humana hepática embrionária

1. Introdução

1.1. Novas substâncias psicoativas

As novas substâncias psicoativas (NPS) são definidas como sendo todo e qualquer novo estupefaciente ou nova droga psicotrópica na sua forma pura, ou por preparar, que não é controlada pela Convenção Única das Nações Unidas de 1961 sobre os estupefacientes nem pela Convenção das Nações Unidas de 1971, mas que possa representar uma ameaça para a saúde pública comparativamente às substâncias listadas nessas convenções (EMCDDA, 2011).

O consumo de NPS tem vindo a aumentar cada vez mais e, no mercado Europeu, em 2015, 100 novas NPS foram adicionadas à lista das já 560 NPS monitorizadas pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (EMCDDA), das quais 70 % foram detetadas nos últimos 5 anos (EMCDDA, 2016).

O EMCDDA tem como função recolher e divulgar informação sobre as drogas controladas pelas convenções de drogas das Nações Unidas. Recentemente, o EMCDDA monitoriza também novas substâncias que não se encontram registadas nestas convenções mas que podem apresentar riscos para a saúde pública ou risco social, tendo esta sido uma medida aprovada pelo Conselho da União Europeia (UE) em 2005 através da Decisão n.º 2005/387/JAI, de 10 de maio de 2005 (EMCDDA, 2009).

As NPS incluem:

- “*Legal Highs*” - baseiam-se num mercado de produtos embalados com uma imagem atrativa e cativante, direcionado para o consumo recreativo. Incluem ainda produtos químicos usados em investigação, vendidos, sobretudo através da *internet*, com o pretexto de serem usados para investigações científicas procuradas por “psiconautas” que exploram os efeitos das substâncias psicoativas.
- Suplementos alimentares - vendidos livremente em lojas de desporto e na *internet* como sendo suplementos dietéticos ou alimentares.
- “*Designer drugs*” - drogas disfarçadas de outras drogas ilícitas já conhecidas como por exemplo o 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) ou a heroína. São produzidas em laboratórios clandestinos por grupos de crime organizado que as disponibilizam no mercado.
- Medicamentos - resultantes do abuso das prescrições médicas e da importação ilegal de medicamentos para a Europa (EMCDDA, 2015).

A nível Europeu, os relatórios emitidos pelas forças de segurança e forças policiais confirmam o crescimento da venda e consumo destas drogas em 2014, tendo sido feitas cerca de 50 000 apreensões, no equivalente a 4 toneladas. Destas, os substitutos legais da *Cannabis*

(canabinóides sintéticos) foram as substâncias mais apreendidas, num total de 1,3 toneladas em 30 000 apreensões, seguindo-se das catinonas sintéticas que podem ser uma alternativa à cocaína, o MDMA e as anfetaminas, num total de 1 tonelada em 8 000 detenções (EMCDDA, 2016).

Uma das principais razões apontadas para o aumento do consumo de NPS reside no facto dos seus produtores terem a capacidade de reagir e de prever os protocolos e controlos legais desenvolvendo NPS com grande rapidez, de modo a abastecer o mercado de consumidores recreativos ou crónicos (EMCDDA, 2016).

As NPS entram na Europa maioritariamente através dos serviços de correio expresso ou através de empresas de transporte que as podem entregar em mão ao consumidor. Os produtores destas substâncias além de expedirem as NPS são capazes de exportar precursores químicos necessários à produção de novas substâncias. Com o crescimento da utilização da *internet*, abriram-se as portas para um mercado com dimensões excepcionais, que, conjugado com o aumento da eficiência, rapidez e baixo custo dos transportes de mercadorias e encomendas, têm contribuído para que a venda de NPS esteja cada vez mais facilitada. De entre os principais países fornecedores de NPS para a Europa encontra-se a China, a qual conquistou o mercado mundial no fornecimento químico e farmacêutico, seguida da Índia, mas em menor escala (EMCDDA, 2016).

Existem vários aspetos que mostram toda a problemática legal e de saúde pública envolvida com estas substâncias:

- 1- Testar produtos desconhecidos consomem muito tempo, é complexo e dispendioso em laboratórios forenses tornando a sua deteção e identificação bastante difíceis.
- 2- Em termos legais, não é possível criminalizar a distribuição não autorizada de todas as substâncias psicoativas, pelo que, em vez de ser proactiva, a Lei apenas pode atuar sobre as substâncias à medida que vão surgindo.
- 3- As NPS podem ser uma ameaça à comunidade, apresentando riscos na saúde pública, riscos pessoais e podendo ser socialmente prejudicial. Contudo, o aparecimento destas substâncias nos mercados pela primeira vez carecem na informação sobre os riscos que lhe podem estar associados.
- 4- Os protocolos legislativos para o submeter determinada substância a controlos legais são bastante morosos sendo que, em alguns países, pode demorar mais do que um ano.
- 5- O controlo de uma NPS pode ter consequências não intencionais, estimulando a sua procura, distribuição e substituição não controlada, podendo ser mais prejudicial do que o seu antecessor.
- 6- Outros controlos não possuem penalidades tão graves que sejam capazes de dissuadir os consumidores ou produtores e mostrar uma séria ameaça para a saúde.

Além disso, não são eficazes na prevenção ou impedimento da sua comercialização e distribuição (EMCDDA, 2011).

Devido ao facto das NPS apresentarem perigos iminentes para a sociedade, os Estados-membro da UE têm-se visto obrigados a atuar sobre estas substâncias, tendo para tal elaborado a Decisão Nº 2005/387/JHA, através da qual foi criado um processo de 3 passos para facilitar a tomada de decisões:

Passo nº 1 - Troca de informação/ alerta prévio

Assim que uma NPS é detetada no mercado Europeu, os Estados-membro da UE asseguram que a informação sobre o seu fabrico, tráfico e utilização é transmitida para a EMCDDA e a Europol via pontos focais nacionais (*national focal points*) e unidades nacionais da Europol (ENUs). Esta informação é também submetida à Comissão Europeia e à Agência Europeia de Medicamentos (EMA). Por fim, caso a EMCDDA e a Europol considerem que a informação sobre a NPS é suficiente para continuar uma monitorização contínua, é apresentado um relatório conjunto ao Conselho da UE, à Comissão Europeia e à EMA, as quais com base na informação fornecida, terão de decidir sobre se é, ou não, necessário prosseguir com o protocolo de avaliação de riscos.

Passo nº 2 - Avaliação de riscos

O Conselho da UE apenas pode proceder com o protocolo de avaliação de riscos caso um quarto dos membros, ou a Comissão Europeia, sejam a favor da prossecução deste passo. O Comité Científico da EMCDDA avalia os possíveis riscos para a saúde pública e social da nova substância identificada e as consequências relacionadas com a sua submissão a um controlo. Um relatório sobre a avaliação de riscos é apresentado ao Conselho da UE, à Comissão Europeia e à EMA para ponderação.

Passo nº 3 - Tomada de decisão

Através da Comissão Europeia, ou um estado membro da UE, com base no relatório de avaliação de riscos, o Conselho da UE tomará uma decisão a adotar definindo se a substância deverá ser, ou não, submetida a medidas de controlo. Estas medidas de controlo e penalidades criminais nos Estados-membro da UE serão decididos em consonância com as leis nacionais (EMCDDA, 2009).

1.2. As drogas em Portugal

De acordo com o Relatório Europeu sobre Drogas de 2015, divulgado a 4 de junho em Lisboa, Portugal apresenta índices de consumo e de tráfico de drogas baixos em relação à média da UE, sendo a prevalência do consumo de NPS no último ano entre os jovens adultos (15 - 24 anos) de aproximadamente de 0,2 % (EMCDDA, 2015).

Desde 2012, em Portugal foram adotadas medidas relativamente à expansão do consumo de NPS, sendo aplicável o regime jurídico relativo ao tráfico e consumo de estupefacientes e substâncias psicotrópicas. Em 2013, devido ao consenso sobre o potencial perigo das NPS na sociedade, foi elaborado o Decreto-lei nº 54/2013, de 17 de abril, no qual é considerado proibida a produção, importação, exportação, publicidade, distribuição, venda ou disponibilização de NPS. Paralelamente a este decreto-lei, foi também publicada a Portaria nº 154/2013, de 17 de abril, com a lista de NPS sob controlo em Portugal (*Decreto-Lei nº. 54/2013 de 17 de abril do Ministério da Saúde, 2013*). De acordo com o mesmo, as NPS são: “... substâncias não especificamente enquadradas e controladas ao abrigo de legislação própria que, em estado puro ou numa preparação, podem constituir uma ameaça para a saúde pública comparável à das substâncias previstas naquela legislação, com perigo para a vida ou para a saúde e integridade podendo induzir alterações significativas a nível da função motora, bem como das funções mentais, designadamente do raciocínio, juízo crítico e comportamento, muitas vezes com estados de delírio, alucinações ou extrema euforia, podendo causar dependência e, em certos casos, produzir danos duradouros ou mesmo permanentes sobre a saúde dos consumidores” (*Decreto-lei nº. 54/2013 de 17 de abril, Artigo 2º*).

Na legislação portuguesa, as NPS incluem várias substâncias desde, feniletilaminas e derivados, piperazinas e derivados, derivados da catinona, canabinóides sintéticos, derivados/análogos da cocaína, plantas e seus constituintes ativos (*Portaria nº. 154/2013 de 17 de abril do Ministério da Saúde, 2013*).

As NPS mais consumidas na comunidade europeia são os canabinóides sintéticos e as catinonas sintéticas (EMCDDA, 2016). Em Portugal o consumo de NPS na comunidade juvenil, ainda é considerado baixo (1 %) comparado com alguns países na UE que possuem percentagens de consumo superiores, é o caso da Estónia e a Polónia a com percentagens de consumo na ordem dos 10 % (ESPAD, 2015).

Nos últimos anos, o consumo recreativo de *Salvia divinorum* (*S. divinorum*) tornou-se bastante frequente a nível mundial, em particular entre os jovens. Além disso, os potentes efeitos que esta planta provoca bem como a produção de intensas alucinações e efeitos de curta duração têm tornado a *S. divinorum* numa planta mundialmente cobiçada (Calado, 2013) sendo considerada uma NPS. De facto, o pequeno investimento necessário para o seu cultivo, paralelamente ao amplo conhecimento de técnicas laboratoriais que podem proporcionar o seu cultivo e o isolamento do seu composto ativo, têm tornado esta planta bastante mais atrativa do que, por exemplo, a síntese de dietilamida do ácido lisérgico (LSD) ou derivados de fenilciclídina (Imanshahidi & Hosseinzadeh, 2006).

1.3. *Salvia divinorum*

1.3.1. Caracterização geral

A *S. divinorum* foi colhida por Wasson e Hoffman em 1962 numa das suas expedições os quais, mais tarde, a entregaram a Epling e Játiva que a identificaram como sendo uma nova espécie pertencente ao género *Salvia*. Até à atualidade, estão descritas cerca de 1 000 espécies do género *Salvia* pertencentes à família Lamiaceae, vulgarmente designada por família da hortelã e que compreende, no total, cerca de 252 géneros (Kowalczyk *et al.*, 2014; Mirzaei *et al.*, 2015; Valdés, 1994). A *S. divinorum* é vulgarmente designada por “*Ska Pastora*” ou “*Ska Maria Pastora*”, tendo nomes mais comuns de entre a comunidade juvenil como “*magic mint*” e “*Diviner’s Sage*”, “*Sally D*” e “*Purple Sticky*” (Lange *et al.*, 2008; Valdés III, Díaz, & Paul, 1983). Até meados dos anos 60, o conhecimento deste género/família esteve restrito a um grupo indígena localizado a nordeste de Oaxaca no México, os Mazatecas, os quais a utilizavam há vários séculos durante as suas cerimónias divinais, processos de cura e na formação de curandeiros (Casselman *et al.*, 2014). Além disso, este grupo utilizava esta planta para o tratamento de diversas doenças tais como, problemas intestinais, dores de cabeça, reumatismo e a sensação de barriga inchada (Díaz, 2013; Valdés III, Díaz, & Paul, 1983).

Trata-se de uma espécie nativa daquela região (Oaxaca - México) que cresce em ambientes bastante húmidos e solos ricos, característicos daquela área geográfica. É uma espécie que pode ser encontrada entre os 750 e os 1500 m de altitude, e pode atingir 1 m de altura. A *S. divinorum* apresenta raízes quadradas ocas, folhas verdes serradas, com um comprimento de 10 a 25 cm e 5 a 10 cm de largura contendo vários tricomas granulares e não-granulares na sua superfície (Casselman *et al.*, 2014). A flor desta planta é formada por uma corola branca com cálices roxos, podendo ter 3 a 4 cm de comprimento, dispostos em panículas contendo cerca de 20 a 30 flores (Casselman *et al.*, 2014; Kowalczyk *et al.*, 2014). Em condições ótimas, a *S. divinorum* cresce e reproduz-se vegetativamente, florescendo esporadicamente aquando os raios solares conseguem penetrar na floresta. O seu florescimento apenas é possível após um período prolongado de escuridão e caso a planta seja exposta à luz o seu florescimento é interrompido e a planta retorna ao seu crescimento vegetativo (Casselman *et al.*, 2014).



Figura 1. *Salvia divinorum* (retirado de (EMCDDA, 2015b)).

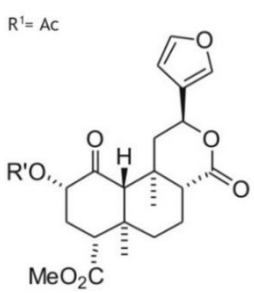
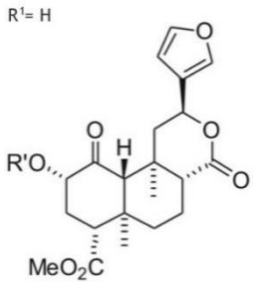
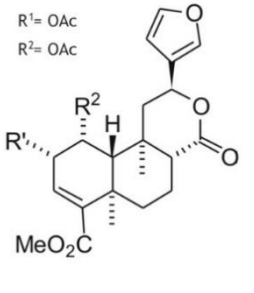
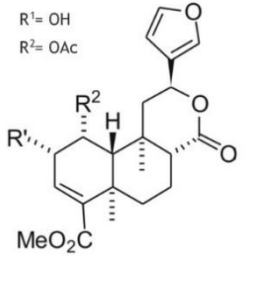
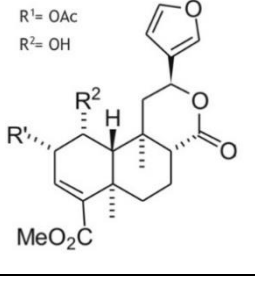
Os produtos naturais com a estrutura de um diterpeno neoclerodano tendem ser muito comuns entre as espécies de *Salvia*, sendo estes os compostos maioritariamente presentes na *S. divinorum*.

Os diterpenos são compostos que são biossintetizados de 4 unidades de isopreno, que nas espécies do género *Salvia*, levam à formação de compostos bicarbocíclicos, tricarbocíclicos, tetracarbocíclicos. Os clerodanos são uma classe estrutural de diterpenos que são derivados do rearranjo de diterpenos bicarbocíclicos. O termo diterpeno neoclerodano foi introduzido para classificar os produtos naturais com uma estrutura molecular de carbono com a mesma estereoquímica que a clerodina (Hanson, 2010).

Em *S. divinorum* foram isolados vários compostos: salvinorinas (A a J), divinorinas (A a F), salvidivinas (A a D) e salvinicinas (A e B), entre outros (Tabela 1) (Bigham *et al.*, 2003; Harding *et al.*, 2005; Kutrzeba, Ferreira, & Zjawiony, 2009; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006; Valdés *et al.*, 2001; Valdes III *et al.*, 1984).

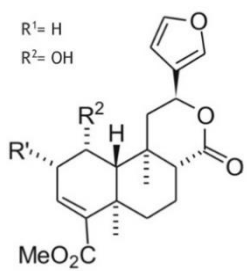
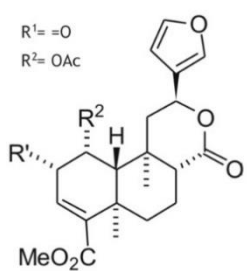
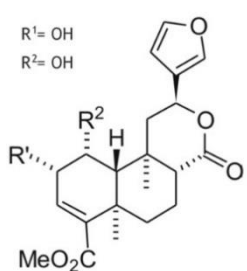
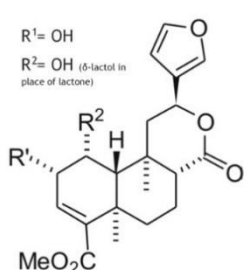
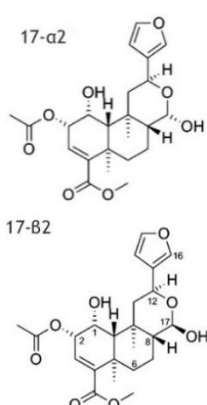
Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinatorina A na expressão hepática de genes

Tabela 1. Substâncias isoladas em *S. divinorum*.

| Substância | Localização | Grupo químico | Estrutura química | % relativa por gr. de folha | Referência(s) |
|-----------------|---------------|---------------------|---|---|---|
| Salvinatorina A | Toda a planta | Clerodano diterpeno | <p>R¹= Ac</p>  | 0,2 % (2 g/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006; Valdes III <i>et al.</i> , 1984) |
| Salvinatorina B | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= H</p>  | 3,8 x 10 ⁻³ % (37 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvinatorina C | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= OAc R²= OAc</p>  | 18 x 10 ⁻³ % (176 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvinatorina D | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= OH R²= OAc</p>  | 19 x 10 ⁻³ % (180 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvinatorina E | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= OAc R²= OH</p>  | 2,9 x 10 ⁻³ % (28 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

Tabela 1. Substâncias isolados em *S. divinorum* (continuação).

| Substância | Localização | Grupo químico | Estrutura química | % relativa por gr. de folha | Referência(s) |
|---------------|-------------|---------------------|---|--|--|
| Salvinorina F | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= H R²= OH</p>  | 10 x 10 ⁻³ % (100 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvinorina G | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= =O R²= OAc</p>  | 0,39 x 10 ⁻³ % (3,8 mg/4,6 Kg) | (Hanson, 2010; Lee <i>et al.</i> , 2005) |
| Salvinorina H | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= OH R²= OH</p>  | 12,4 x 10 ⁻³ % (120 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvinorina I | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= OH R²= OH (δ-lactol in place of lactone)</p>  | 0,67 x 10 ⁻³ % (6,5 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvinorina J | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>17-α2</p>  <p>17-B2</p> | 2,3 x 10 ⁻⁵ % (2,3 mg/10 Kg) | (Kutrzeba, Ferreira, & Zjawiony,, 2009) |

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinatorina A na expressão hepática de genes

Tabela 1. Substâncias isolados em *S. divinorum* (continuação).

| Substância | Localização | Grupo químico | Estrutura química | % relativa por gr. de folha | Referência(s) |
|----------------|-------------|---------------------|---|--|--|
| Divinatorina A | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= H R²= OH R³= H R⁴= H</p> <p>R⁴O₂C</p> | 22,6 x 10 ⁻³ % (219 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Divinatorina B | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= H R²= OH R³= OH R⁴= Me</p> <p>R⁴O₂C</p> | 2,99 x 10 ⁻³ % (29 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Divinatorina C | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= H R²= H R³= OAc R⁴= H</p> <p>R⁴O₂C</p> | 0,435 x 10 ⁻³ % (20 mg/4,6 Kg) | (Hanson, 2010; Lee <i>et al.</i> , 2005) |
| Divinatorina D | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= H R²= OH R³= OAc R⁴= Me</p> <p>R⁴O₂C</p> | 0,326 x 10 ⁻³ % (15 mg/4,6 Kg) | (Hanson, 2010; Lee <i>et al.</i> , 2005) |
| Divinatorina E | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= H R²= OH R³= =O R⁴= Me</p> <p>R⁴O₂C</p> | 0,217 x 10 ⁻³ % (10 mg/4,6 Kg) | (Hanson, 2010; Lee <i>et al.</i> , 2005) |

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinatorina A na expressão hepática de genes

Tabela 1. Substâncias isolados em *S. divinorum* (continuação).

| Substância | Localização | Grupo químico | Estrutura química | % relativa por gr. de folha | Referência(s) |
|----------------|-------------|---------------------|--|--|--|
| Divinatorina F | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= OH R²= OH R³= OH R⁴= Me</p> | 1,55 x 10 ⁻³ % (15 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvidivina A | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= =O R²= OH</p> | 8,76 x 10 ⁻³ % (85 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvidivina B | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= OH R²= =O</p> | 8,25 x 10 ⁻³ % (80 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvidivina C | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= =O R²= OH</p> | 4,23 x 10 ⁻³ % (41 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |
| Salvidivina D | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹= OH R²= =O</p> | 4,33 x 10 ⁻³ % (42 mg/970 g) | (Hanson, 2010; Shirota, Nagamatsu, & Sekita, 2006) |

Tabela 1. Substâncias isolados em *S. divinorum* (continuação).

| Substância | Localização | Grupo químico | Estrutura química | % relativa por gr. de folha | Referência(s) |
|---------------|-------------|---------------------|--|---|--|
| Salvinicina A | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹ = β-OMe R² = β-OMe</p> | 70,7 x 10 ⁻³ % (65 mg/92 g) | (Hanson, 2010; Harding <i>et al.</i> , 2005) |
| Salvinicina B | Folhas | Clerodano diterpeno | <p>R¹ = α-Ome R² = α-Ome</p> | 15,2 x 10 ⁻³ % (14 mg/92 g) | (Hanson, 2010; Harding <i>et al.</i> , 2005) |

De entre as centenas de espécies pertencentes ao género *Salvia*, a *S. divinorum* é a única que apresenta propriedades alucinogénias. Siebert (1999) propôs uma escala para classificar os efeitos produzidos pelo consumo desta planta que consiste em 6 níveis de intensidade e é conhecida como a escala S-A-L-V-I-A (Calado, 2013):

- S - 1º nível de efeitos subtis, estado que antecipa a meditação;
- A - 2º nível de perceção alterada, estágio sem visões;
- L - 3º nível de visões ligeiras, visões em que não se confunde com a realidade;
- V - 4º nível de visões vividas, visões realistas que ocorrem com olhos abertos ou fechados;
- I - 5º nível de existência imaterial, onde a noção da realidade é completamente distorcida;
- A - 6º nível de efeitos amnésicos, perda completa ou parcial da consciência.

O composto que tem mostrado maior interesse quer na comunidade científica quer entre os seus utilizadores, é a salvinorina A (SA) devido às suas características estruturais e aos seus potentes efeitos psicotrópicos.

1.4. Salvinorina A

1.4.1. Contextualização

A SA e a Salvinorina B (SB) foram primeiramente identificadas por Ortega *et al.* (1982) sendo que a sua caracterização enquanto constituinte bioativo foi inicialmente reportada por Valdés III *et al.* (1984) através da identificação da divinatorina A e da divinatorina B, tendo sido mais tarde descoberto que se tratavam das mesmas moléculas que haviam sido isoladas anteriormente (Cunningham *et al.*, 1982; Valdes III *et al.*, 1984).

Um estudo *in vitro* usando isótopos estáveis demonstrou que este composto é biossintetizado via deoxilulose fosfato onde é armazenada principalmente nos tricomas glandulares (Kutrzeba *et al.*, 2007; Siebert, 2004). É pela via deoxilulose fosfato que se inicia a formação dos terpenos pelo difosfato isopentenil (IPP) e difosfato dimetilalil (DMAPP) (Eisenreich, Rohdich, & Bacher, 2001). A concentração de SA nas folhas da *S. divinorum* varia entre 0,89 a 3,70 mg/g peso seco (Gruber *et al.*, 1999).

A SA produz efeitos alucinogénios intensos diferentes dos alucinogénios tradicionais, sendo descritos pelos seus consumidores como possibilitando “a experiência de se tornarem objetos, terem visões de superfícies bidimensionais e realizarem viagens a locais do passado, acompanhados de perda do controlo do corpo, várias sensações de empurro ou torsão, riso histórico descontrolado e alteração da percepção da realidade” (Siebert, 1994) .

1.4.2. Características físico-químicas

A SA é um diterpeno neoclerodano com fórmula molecular $C_{23}H_{28}O_8$ (432 g.mol⁻¹) e nome IUPAC 2*S*,4*aR*,6*aR*,7*R*,9*S*,10*aS*,10*bR*-9-(acetiloxi)-2-(3-furanilo)dodecahidro-6*a*,10*b*-dimetil-4,10-dioxo-2*H*-nafto[2,1-*c*]pirano-7-éster metílico do ácido carboxílico (PubChem, 2005).

O seu espectro de massa por ionização de eletrões apresenta fragmentos em *m/z* 94, 55, 121, 107, 273, 166, 220, 252, 234, 359, 318, 404 and 432 (Pentea *et al.*, 2015). Não pertence ao grupo dos alcalóides por não ter na sua estrutura o grupo azotado que, se pensava até então ser uma característica essencial para os alucinogénios (Cunningham *et al.*, 2011).

A SA pura, extraída de folhas secas ou de extratos da folha é estável à temperatura ambiente e é solúvel em solventes orgânicos, como acetona, acetonitrilo, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol. A SA é instável em soluções básicas e insolúvel em hexano e água. Na sua forma pura a SA forma cristais coloridos com um ponto de fusão entre 242 - 244 °C (EMCDDA, 2015b).

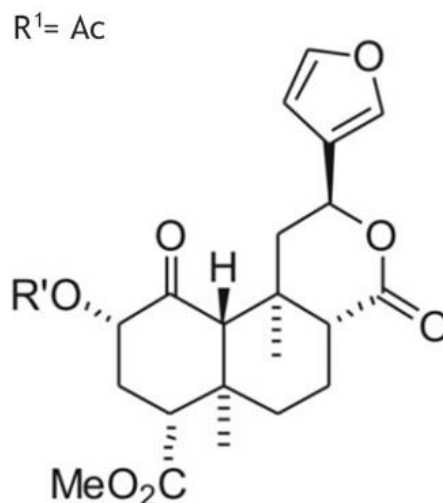


Figura 2. Estrutura molecular da salvinorina A (retirado de (Hanson, 2010)).

1.4.3. Farmacocinética

A *S. divinorum* pode ser consumida de várias formas de modo a produzir efeitos psicotrópicos. Quando é administrada sob a forma de *spray* por via oral a SA é absorvida pela mucosa oral. Porém, apenas uma pequena percentagem é absorvida devido ao fluxo salivar. Através desta forma de consumo os seus efeitos psicotrópicos podem ser observáveis 5 a 10 min após o seu consumo prolongando-se por cerca de 1 h (Siebert, 1994). O modo mais eficaz para a obtenção dos efeitos psicotrópicos é através da inalação do composto vaporizado. Neste, são necessários apenas 200 - 500 µg de SA para se alcançarem os efeitos alucinogénios semelhantes aos produzidos pelas folhas frescas. Após a inalação do produto vaporizado os efeitos são notáveis logo após 30 seg, sendo mais intensos durante cerca de 5 a 10 min e diminuindo de intensidade até 20 a 30 min após o seu consumo (Siebert, 1994).

A mucosa oral difunde a SA lentamente na corrente sanguínea. Assim, quando esta é administrada oralmente, os seus efeitos iniciam-se gradualmente e duram mais do que quando o composto é vaporizado e inalado. Porém, apesar de constituírem métodos diferentes de consumo, ambos apresentam os efeitos similares, ainda que com diferentes tempos de duração (Siebert, 1994).

A SA apresenta um rápido início de reação e uma curta duração. Penetra no sistema nervoso central (SNC) após alcançar a circulação sistémica via absorção bucal, ingestão oral ou do fumo, sendo a última o método que apresenta uma maior taxa de penetração no SNC. Para tal, a sua elevada lipofilicidade e o seu baixo peso molecular são características cruciais na sua passagem pela barreira hemato-encefálica. De facto, dado que a SA tem apenas 432 Da e é uma molécula altamente lipofílica, facilmente se explica a sua rápida penetração no SNC. Visto que a sua ação é de curta duração isto sugere que a sua eliminação do organismo é também ela bastante

rápida. Apesar de conseguir atingir o SNC rapidamente, a sua concentração neste órgão é bastante menor que a mesma no plasma (Teksin *et al.*, 2009).

A SA é um substrato da glicoproteína P a qual, entre outras funções, é uma das responsáveis pelo transporte de compostos estranhos do interior das células para sua posterior eliminação e, por isso, responsável pela baixa concentração de SA no SNC (Butelman *et al.*, 2012). Porém deve-se ter em conta o estado funcional deste transportador quando se trata de humanos, na medida em que vários fatores, tais como, fatores genéticos ou presença ou exposição crónica a outras substâncias, podem alterar o funcionamento desta bomba de efluxo dependente de adenosina trifosfato (ATP) (Butelman *et al.*, 2012).

Um estudo realizado em macacos Rhesus conduzido por Schimdt *et al.* (2005) mostrou que a SA apresenta uma rápida distribuição com um tempo de meia vida de $37,9 \pm 5,6$ min em animais do sexo masculino sendo o mesmo tempo bastante superior no sexo feminino ($80,0 \pm 13,1$ min) (M. Schmidt *et al.*, 2005). Hooker *et al.* (2008) sintetizou SA marcada no ^{11}C e realizou um estudo tomográfico por emissão de positrões com a finalidade de medir a sua farmacocinética e distribuição no cérebro e em órgãos periféricos em primatas fêmeas. Também neste estudo os resultados demonstraram uma rápida captação no SNC com uma distribuição maioritariamente localizada no cerebelo. Adicionalmente, a cinética nos órgãos periféricos sugeriu pelo menos 2 modos de metabolismo e a eliminação via excreção renal e biliar (Fichna *et al.*, 2009; Hooker *et al.*, 2008).

Devido à sua estrutura química, esta substância mostra poder ser um substrato para as enzimas do citocromo P450 (CYP450). Além disso, dado que a SA possui um grupo éster na sua estrutura, este apresenta um potencial local de metabolismo hidrolítico pelas carboxilesterases (Ces), ou metabolismo conjugativo (glucuronidação) com as glucuronosiltransferases (UGTs). Num estudo feito por Teksin *et al.* (2009) que pretendia identificar as enzimas que estão envolvidas na metabolização da SA, foi realizado um *screening* com várias isoformas humanas do CYP450 e a glucuronosiltransferase 2B7 (UGT 2B7), tendo-se observado que as enzimas que participam mais ativamente na metabolização da SA são as isoformas do CYP450 2D6 (CYP 2D6), 1A1, 2C18 e 2E1 e a UGT 2B7 com uma taxa de metabolização de $14,7 \pm 0,80$, $31,1 \pm 1,20$, $20,6 \pm 1,00$, $22 \pm 0,80$ e $51,0 \pm 4,00$ % respetivamente, quando incubadas com $5 \mu\text{M}$ de composto (Teksin *et al.*, 2009).

Um outro estudo mostrou que a SB é o metabolito inativo resultante da metabolização primária da SA por esterases no sangue (M. S. Schmidt *et al.*, 2005).

1.4.4. Mecanismo de Ação

A SA pode causar efeitos psicotrópicos e, apesar de ser estruturalmente diferente de todos outros alucinogénios conhecidos, tem atividade num recetor particular da região cerebral. Um estudo realizado em que envolveu cerca de 50 recetores, transportadores e canais iónicos do SNC foi conduzido por Roth *et al.* (2002), tendo mostrado que a SA apresenta uma característica única - é um agonista eficaz seletivo não-azotado dos recetores *kappa* opióides (KOR) (Roth *et*

al., 2002). Os KOR pertencem ao sistema opióide, um sistema neuromodulador, amplamente expresso no SNC e sistema nervoso periférico. O sistema opióide é composto por 3 recetores opióides acoplados à proteína G, μ (*mu*), Δ (*delta*) e κ (*kappa*) que, em determinadas condições fisiológicas, são ativados por uma família de péptidos endógenos de modo a inibir a atividade neuronal. Entre os péptidos opióides, os primários que ativam os KOR são as dinorfinas, os quais apresentam baixa afinidade para os recetores μ e Δ (Lalanne *et al.*, 2014).

Segundo McCurdy *et al.* (2006) os agonistas dos KOR têm sido usados no tratamento da dor, dependência, distúrbios alimentares e depressões na medida em que os estudos têm demonstrado que os agonistas dos KOR atenuam alguns efeitos neuroquímicos e comportamentais produzidos por certas drogas de abuso (Diaz, 2013). Assim, a SA poderá ter um potencial terapêutico visto que partilha várias vias metabólicas semelhantes a certas drogas de abuso tais como codeína e morfina (UGTs), oxicodona, MDMA, tetra-hidrocanabinol, e cetamina (CYP450) e cocaína (Ces) (Teksin *et al.*, 2009).

A analgesia, depressão respiratória e dependência física pensavam-se ser mediadas pelo recetor μ . No entanto, estudos realizados mostraram que os KOR regulam a analgesia e podem ainda mediar a sedação, sendo que a produção de analgesia via KOR pode ser vantajosa na medida em que poderá evitar os efeitos indesejados da analgesia mediada por recetores μ (Lahti *et al.*, 1985).

Após a identificação dos KOR, novos analgésicos agonistas deste recetor têm sido desenvolvidos para evitar a dependência causada pelos recetores μ . Porém, estes analgésicos têm vindo a provocar alguns efeitos indesejados tais como disforia e alucinações. Ainda assim, alguns analgésicos agonistas de KOR como por exemplo a pentazocina, são atualmente usados no controlo da dor em indivíduos com risco de abuso de drogas (Chavkin, 2011).

Normalmente, os agonistas de KOR produzem uma diminuição na atividade locomotora porém a SA induz essa atividade sugerindo que outros mecanismos estão envolvidos nos seus efeitos farmacológicos. De facto, vários estudos têm mostrado que a SA tem a capacidade de modificar as vias dopaminérgicas pela diminuição dos níveis de dopamina no *putamen caudate* e nos níveis de neurotransmissão no estriado dorsal pela regulação da libertação da dopamina e não pela sua captação (Listos, Merska, & Fidecka, 2011). Um estudo conduzido por Grilli *et al.* (2009) demonstrou que a SA inibe a libertação de dopamina e serotonina nos sinaptossomas isolados do estriado e córtex pré-frontal de rato, enquanto estimula a libertação de noradrenalina do sinaptossomas do hipocampo (Grilli *et al.*, 2009). Os mesmos autores revelaram que a SA diminui a concentração extracelular de dopamina no *nucleus accumbens* e não afeta a concentração de serotonina. Neste trabalho, os autores discutiram que um comprometimento da via mesolímbica dopaminérgica está envolvida na indução pela SA na disforia e a diminuição da biodisponibilidade da serotonina poderá ser responsável pelos efeitos sedativos desta substância (Grilli *et al.*, 2009).

Também o sistema endocanabinóide poderá estar envolvido nos efeitos farmacológicos da SA, na medida em que, os seus efeitos em baixas concentrações podem ser revertidos pela norbinaltorfimina, um antagonista seletivo dos KOR, e também pelo rimonabante que é um

antagonista dos recetores canabinóides. Contudo, um estudo *in vitro* por Roth *et al.* (2002) demonstraram que a SA não possui qualquer afinidade para os recetores canabinóides 1 (CB₁), e a sua atividade *in vivo* é distinta da que é induzida por canabinóides. Um exemplo é o tetrahidrocanabinol, o qual diminui a temperatura corporal e produz efeitos antinociceptivos e catalepsia ao passo que SA tem uma capacidade de induzir hipotermia e catalepsia significativamente menor. Por esta razão, os autores propõem a hipótese de que a SA não ativa diretamente os recetores canabinóides mas sim através de vias indiretas (Listos, Merska, & Fidecka, 2011).

Também interessante é o facto de a SA não apresentar qualquer tipo de afinidade pelos recetor 5-HT_{2A} ou a sua ativação posterior, que são alvos principais dos alucinogénios conhecidos tais como LSD, dimetiltryptamina, psilocibina, mescalina entre outros (Roth *et al.*, 2002). Além disso, os efeitos profundos provocados por este composto em humanos são devidos à sua alta eficiência na ativação dos KOR (Chavkin *et al.*, 2004). Porém, os outros diterpenos isolados de *S. divinorum* também foram estudados para perceber os seus efeitos. Estes estudos mostraram ainda que a SB não tem atividade nos KOR, a salvinorina C tem fraca afinidade para estes recetores e não produz efeitos psicotrópicos e a salvinorina G e divinorina D são os únicos a apresentar alguma afinidade para os mesmos (Vortherms & Roth, 2006).

1.4.5. Métodos de deteção

Devido sobretudo ao elevado crescimento na sua procura para uso recreativo e também na falta de conhecimento na comunidade científica para a sua deteção, vários trabalhos foram já realizados de modo a desenvolver novos meios de deteção de SA.

Num estudo realizado por Pichini *et al.* (Pichini *et al.*, 2005) foram analisadas amostras de plasma, urina e saliva provenientes de voluntários que fumaram 75 mg de planta frescas de *S. divinorum*. A cromatografia gasosa com espetrometria de massa foi a técnica analítica selecionada para identificar e quantificar a SA tendo-se obtido limites de deteção e quantificação de 5 ng/mL. No mesmo estudo, os investigadores observaram ainda que a concentração de SA em urina e saliva variou entre 0,0015 e 5 µg/mL sendo que na urina foram obtidas concentrações de 2,4 e 10,9 ng/mL e na saliva 11,1 e 25 ng/mL (Pichini *et al.*, 2005) Através de cromatografia líquida de alta eficiência foram analisadas amostras de urina e plasma de humanos e macacos *Rhesus*, tendo-se obtido limites de deteção e quantificação de 2 ng/mL. Além disso, este trabalho demonstrou ainda que a SB é o metabolito primário da SA (M. S. Schmidt *et al.*, 2005).

Em 2008 McDonough *et al.* (2008) com recurso à extração em fase sólida e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, analisou amostras de urina e sangue humano para determinar SA. Foram obtidos limites de deteção e de quantificação de 2,5 ng/mL e 5 ng/mL respetivamente. A eficiência de extração foi de 71,7% (McDonough *et al.*, 2008).

Além destes estudos realizados com amostras convencionais, Margalho *et al.* (2013) realizou um estudo em amostras alternativas *post-mortem*, concretamente humor vítreo líquido

pericárdico, para além de sangue total e plasma. As amostras foram analisadas por extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Os limites de deteção e quantificação obtidos foram de 5 ng/mL com utilização de apenas 100 µL de amostra de humor vítreo e 250 µL de líquido pericárdico, sangue total e plasma (Margalho *et al.*, 2013). Nesse mesmo ano, Moreno *et al.* (2013) dosearam SA em amostras de urina através de microextração por adsorvente empacotado (MEPS) combinado com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Esta técnica permitiu a obtenção de limites de deteção de 5 ng/mL e limites de quantificação de 20 ng/mL, recorrendo a volumes de amostra de 200 µL. A principal vantagem deste estudo foi a utilização da MEPS, já que quando comparada com a extração em fase sólida convencional, a MEPS tem como vantagem o facto de ser menos morosa e de não ser necessária a utilização de solventes orgânicos (Moreno *et al.*, 2013)

1.4.6. Potenciais efeitos terapêuticos

O tratamento terapêutico com recurso a plantas com características medicinais é um dos métodos medicinais mais antigos na humanidade (Petrovska, 2012). Os produtos naturais derivados de plantas medicinais têm demonstrado ser uma fonte de compostos bioativos em que muitos destes têm sido a base para o desenvolvimento de novas substâncias químicas para a indústria farmacêutica (Palombo, 2011). Assim, alguns estudos realizados com *S. divinorum* e o seu composto bioativo, demonstraram que esta possui alguns efeitos com um potencial interesse para a terapia humana, como a toxicodependência, tratamento de dores, doenças neurológicas, gastrointestinais e agente anti-inflamatório (Braidia *et al.*, 2008, 2009; Ebner *et al.*, 2010; Fichna *et al.*, 2012; Hanes, 2001; Kivell, Ewald, & Prisinzano, 2014; McCurdy *et al.*, 2006; Nemeth *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2012; Xin *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2005).

1.4.6.1. Toxicodependência

Geralmente, a toxicodependência comporta três ciclos distintos de evolução: primeiro, o estágio de “binging” no qual o consumidor procura outras formas para obter os efeitos da droga; o segundo estágio onde o consumidor sofre sintomas de abstinência; e, por último, o estágio da antecipação que leva à necessidade da administração de drogas (Kivell, Ewald, & Prisinzano, 2014). Uma das características mais relevantes da SA é o seu efeito anti-aditivo o qual já foi descrito em estudos de comportamento realizados em ratos: em ratos tratados com SA em baixas doses (0,1 - 40 µg/Kg), os efeitos de compensação foram demonstrados quer em testes de administração quer de preferência, porém, quando os ratos são tratados com altas doses de SA (160 µg/Kg) apresentam efeitos aversivos (Braidia *et al.*, 2008).

Estudos realizados mostraram que os níveis de dopamina no *nucleous accumbens* (NAc) têm um papel importante na regulação dos efeitos de compensação em drogas de abuso, comida e relações (Kivell, Ewald, & Prisinzano, 2014) e a sua regulação nesta zona cerebral poderá estar

subjacente aos efeitos provocados pela SA. De facto, autores observaram que a SA diminui os níveis de dopamina no NAc em ratos (Ebner *et al.*, 2010) e no *putamen caudate* em ratinhos (Zhang *et al.*, 2005). Neste contexto, a SA poderá ser usada no tratamento de toxicod dependentes devido à diminuição dos níveis de dopamina e subsequente ativação dopaminérgica que está relacionada com o comportamento de administração de drogas nestes indivíduos (Freeman *et al.*, 2014).

Outra hipótese possível para o uso de SA no tratamento da toxicod dependência reside na semelhança de várias vias metabólicas com certas drogas de abuso, possibilitando a partilha de vias metabólicas, a qual poderá proporcionar a ocorrência de interações fármaco-fármaco podendo, por sua vez, potenciar efeitos aditivos, sinérgicos ou antagónicos (Teksin *et al.*, 2009).

Suportando esta hipótese um estudo realizado a 500 consumidores regulares de *S. divinorum* reportou uma percentagem não significativa de 0,6 % de consumidores que sentiam dependência do consumo da planta (Baggott, Erowid, & Erowid, 2004) sendo que, até à atualidade, resultados similares foram obtidos por outros autores (Johnson & Griffiths, 1996).

1.4.6.2. Efeitos antinociceptivos

Um outro efeito farmacológico importante da SA é a sua capacidade de promover efeitos antinociceptivos associados a uma estimulação seletiva curta (até 20 min) dos KOR no SNC demonstrado em ratinhos em testes de “*tail-flick*” (McCurdy *et al.*, 2006), nos quais se observou que antagonistas dos recetores opióides μ e Δ não afetaram a resposta antinociceptiva da SA reforçando esta molécula como agonista puro dos KOR (John, French, & Erlichman, 2006).

Num outro trabalho (Fichna *et al.*, 2012) foram estudadas as respostas comportamentais à dor através da injeção intracardíaca de óleo de mostarda em ratinhos os autores observaram que a injeção intraperitoneal de SA apresentou efeitos antinociceptivos.

A medicação opióide tem sido usada no tratamento da dor com elevadas taxas de sucesso. No entanto, como qualquer medicação tem efeitos positivos e negativos, estudos têm mostrado que certos medicamentos opióides podem causar dependência, problemas respiratórios, a necessidade de doses mais elevadas que poderá causar *overdoses* (Falla, 1999). Como descrito anteriormente, a SA apresenta efeitos antinociceptivos e ainda, não causa qualquer dependência e tem um perfil fisiológico seguro (Johnson *et al.*, 2011), mostrando assim novas possibilidades para o desenvolvimento de novos opióides para o tratamento da dor.

1.4.6.3. Doenças neurológicas

Um outro efeito que foi reportado em vários casos e estudos prévios é o efeito antidepressivo da SA. Um destes casos foi uma mulher de 26 anos de idade diagnosticada com depressão crónica. Após fumar as folhas da *S. divinorum* demonstrou-se que esta tinha efeitos

antidepressivos. Esta paciente começou a consumir oralmente baixas doses de *S. divinorum*, três vezes ao longo da semana mastigando as folhas e mantendo-as na boca durante 15 a 30 min e após 6 meses de consumo os sintomas da depressão foram anulados (Hanes, 2001).

Estes efeitos antidepressivos foram demonstrados e confirmados em testes de nado forçado com ratos: doses entre 0,001 - 1000 µg/Kg induziram efeitos antidepressivos que foram inibidos com nor-binaltorfimina, um antagonista seletivo dos KOR (Braidá *et al.*, 2009). Contudo, um outro estudo também realizado em ratos demonstrou que doses mais elevadas de SA (2 mg/Kg) produziram efeitos depressivos, para além de uma diminuição na atividade locomotora e uma atenuação do comportamento (Ebner *et al.*, 2010). Por estes motivos, alguns autores concluem que a SA poderá ser usada no tratamento da depressão em baixas doses.

A SA apresenta ainda efeitos ansiolíticos em ratos tratados com doses entre 0,001 a 1000 µg/Kg enquanto doses mais altas (2 mg/Kg) produzem insuficiência cognitiva semelhante à cetamina, um potente agonista dos KOR, o que implica que os KOR possam estar envolvidos em alterações cognitivas em distúrbios psiquiátricos como a esquizofrenia (Braidá *et al.*, 2009; Nemeth *et al.*, 2015).

Ainda disso, a SA demonstrou ainda ter um efeito neuroprotetor através do KOR e na modulação da expressão da aquaporina 4 em lesões cerebrais induzidas por isquemia prevenindo a formação de edema cerebral e a lesão neuronal no hipocampo, córtex e estriado (Xin *et al.*, 2016). Outros agonistas dos KOR demonstraram igualmente papéis neuroprotetores mas acompanhados de alguns efeitos secundários indesejados, ao contrário da SA, a qual pelo seu rápido metabolismo não demonstra provocar depressão respiratória tornando-a adequada para o tratamento de acidentes vasculares cerebrais, paragens cardíacas e asfixia (Su *et al.*, 2012).

1.4.6.4. Doenças gastrointestinais

Capasso *et al.* (2008) descreveram que a SA inibe a motilidade gastrointestinal em ratos, acompanhados por uma inflamação do intestino (Capasso *et al.*, 2008). Num outro estudo realizado pelos mesmos autores em íleo de porcos da Índia, foi demonstrado que a SA induziu a inibição da transmissão colinérgica mio-entérica através da ativação KOR, sugerindo que *S. divinorum*, e SA, podem constituir uma base farmacológica para o tratamento de diarreia (Capasso *et al.*, 2006).

1.4.6.5. Agente anti-inflamatório

Estudos realizados anteriormente mostraram que a SA despoletou efeitos anti-inflamatórios em dois modelos de colite em ratos, mediado pelos KOR e recetores CB₁, tendo produzido ainda efeitos analgésicos em ratos com inflamação intestinal aguda (Fichna *et al.*, 2012).

Como descrito, a SA é um agonista seletivo dos KOR sem afinidade para os recetores canabinóides (Roth *et al.*, 2002). Assim, a ativação do sistema canabinóide poderá ser devido

à formação de recetores heterodímeros de KOR-CB₁ ou pela influência da sinalização intracelular em sequência. Com esta descoberta, estão a ser desenvolvidas novas substâncias baseadas na estrutura da SA, as quais misturam propriedades de agonistas do sistema opióide/canabinóide que modulam a atividade fisiológica de ambos os sistemas endógenos. Estes compostos poderão ser mais eficazes quando comparados com agonistas seletivos (Fichna *et al.*, 2012).

Os macrófagos são células importantes na vigilância do sistema imune que, quando ativadas, produzem moléculas bioativas, como os leucotrienos, um tipo de mediador inflamatório. Os leucotrienos estão envolvidos em várias doenças inflamatórias e autoimunes incluindo a asma, rinite alérgica e doenças cardiovasculares (Rossi *et al.*, 2016). A SA inibe a produção de leucotrienos em macrófagos ativados através de um mecanismo ainda desconhecido, envolvendo enzimas ou processos regulatórios na biossíntese de leucotrienos, sugerindo um novo mecanismo da SA como agente anti-inflamatório e possivelmente um tratamento para as doenças relacionadas com estas moléculas (Rossi *et al.*, 2016).

1.5. Fígado

O fígado é um dos maiores órgãos no organismo humano, podendo pesar entre 2% a 3% do peso do corpo humano (Abdel-Misih & Bloomston, 2010). É considerado um órgão crucial no sistema digestivo e tem também um papel preponderante na metabolização e regulação do organismo. O fígado encontra-se alojado na parte inferior do diafragma no quadrante superior da cavidade abdominal e encontra-se protegido pelas costelas (Openstax College, 2013).

É formado por 2 lóbulos primários, um lóbulo grande (direito) e um lóbulo mais pequeno (esquerdo). No lóbulo direito encontra-se um lóbulo inferior quadrado e um lóbulo posterior caudado. O fígado está ligado à parede abdominal e ao diafragma por 5 ligamentos (falciforme, coronário, 2 laterais e redondo) (Openstax College, 2013).

A porta hepática é onde a artéria hepática e a veia porta hepática penetram no fígado. A artéria hepática entrega sangue oxigenado proveniente do coração para o fígado enquanto a veia porta hepática entrega sangue contendo nutrientes absorvidos no intestino delgado. Além disso, nutrientes, drogas, fármacos e toxinas são também nele absorvidos. Depois de processar substâncias nocivas e toxinas, o fígado liberta para o sangue nutrientes necessários para outras células, que seguem a veia central e depois a veia hepática para a cava veia inferior. Com esta circulação pela porta hepática, todo o sangue envolvido na digestão passa através do fígado (Openstax College, 2013).

As substâncias endógenas e exógenas no organismo que não sejam necessárias para a homeostase do organismo são metabolizadas para serem posteriormente eliminadas do organismo (Kuntz & Kuntz, 2008).

O fígado é um órgão central na degradação e destoxificação de substâncias, porém algumas substâncias poderão tornar-se ativas após sofrerem metabolização, como por exemplo o

inseticida paratição, os radicais livres reativos resultantes da metabolização do tetracloreto de carbono ou o potencial carcinogénico do benzopireno, da aflatoxina e da nitrosamina (Kuntz & Kuntz, 2008).

Apesar do composto bioativo de *S. divinorum* ser um composto que afeta maioritariamente o SNC porém, o sistema hepático, principalmente o fígado, é o órgão com uma maior capacidade de metabolização de substâncias exógenas e assim é de interesse científico perceber o efeito que a SA pode ter ao nível da citotoxicidade hepática e da expressão de certos genes de modo a entender melhor a sua farmacocinética e perceber que efeitos o seu consumo poderá ter no organismo. No presente estudo foram estudados os seguintes genes: citocromo C (Cit. C), algumas isoformas da família de CYP450, apolipoproteína B100 (Apo B100), carboxilesterase 1 (Ces 1), e glucuronosiltransferase 1A1 (UGT 1A1).

1.6. Proteínas Hepáticas

O fígado expressa diversas proteínas hepáticas, porém, a seguir, serão apenas abordadas as que foram incluídas no presente estudo.

1.6.1. Citocromo C

O complexo citocromo pertence à família de proteínas do Cit. C e é uma proteína heme associada à membrana interior da mitocôndria (Akaberi, Mehri, & Iranshahi, 2015). O seu precursor, apocitocromo C é sintetizado nos ribossomas livres do citoplasma e pode ser incorporado espontaneamente na membrana exterior da mitocôndria. A interação entre o precursor e o citocromo heme liase leva à incorporação do grupo heme levando ao *refold* da proteína e à libertação para o espaço intermembranar da mitocôndria. Ao contrário dos outros citocromos, o Cit. C é altamente solúvel e é um componente essencial da cadeia transportadora de eletrões, na qual apresenta uma função bem específica de transferência de um eletrão entre o complexo III (ubiquinol: citocromo C oxidoreductase) e o complexo IV (citocromo oxidase). É uma molécula capaz de sofrer oxidação e redução porém não liga ao oxigénio (Akaberi, Mehri, & Iranshahi, 2015; Cai, Yang, & Jones, 1998).

O Cit. C é também um intermediário da apoptose, uma forma controlada de morte das células em desenvolvimento ou em resposta às infeções ou dano no ácido desoxirribonucleico (DNA). Porém, para o Cit. C se tornar num intermediário da apoptose necessita de passar por 2 processos importantes: primeiro, necessita de perder a ligação com o lípido cardiolipina, que tem a função de ancorar proteínas na membrana celular. Durante a fase inicial da apoptose a produção de espécies reativas de oxigénio mitocondriais é estimulada, e a cardiolipina é oxidada pelo complexo funcional peroxidase cardiolipina-Cit. C. Esta oxidação leva à dissociação do Cit. C da cardiolipina permitindo que esta fique no seu estado solúvel. Dado que nesta altura o Cit. C se encontra num estado solúvel e numa forma livre, o último passo

necessário para se tornar intermediário da apoptose é, atingir o citoplasma da célula e isto apenas é possível após a permeabilização da membrana exterior da mitocôndria, facilitando assim a libertação do Cit. C para o citoplasma da célula através dos poros da membrana exterior da mitocôndria (Akaberi, Mehri, & Iranshahi, 2015; Ott *et al.*, 2002). A libertação do Cit. C leva à ativação da caspase 9 e esta por sua vez irá ativar as caspases 3 e 7, ambas responsáveis pela destruição da célula (Soediono, 1989; Akaberi, Mehri, & Iranshahi, 2015).

1.6.2. Citocromos P450

Os genes dos CYP450 codificam uma família multigenética de monooxigenases com várias funções responsáveis pelo metabolismo oxidativo da fase I de um grande leque de substratos (Smith *et al.*, 1998). Visto que possuem um grupo heme na sua estrutura, estas moléculas estão envolvidas na catalização de várias reações, como oxidação dos grupos C-, N-, e S- e desalquilação (Androutsopoulos, Tsatsakis, & Spandidos, 2009).

As enzimas CYP450, famílias 1 a 4, podem ser encontradas no retículo endoplasmático onde, juntamente com a carbonil redutase (NADPH-450 redutase), constituem elementos principais no metabolismo de compostos. Apesar das reações mediadas pelas enzimas CYP450 serem processos de destoxificação, muitos compostos tornam-se ativos após o metabolismo de outros compostos por estas enzimas, dando origem a produtos de reação com maior toxicidade e mutagenicidade. (Smith *et al.*, 1998).

1.6.2.1. CYP450 isoforma 1A2

A CYP450 isoforma 1A2 (CYP 1A2) é uma enzima quase exclusivamente expressa no fígado na ordem de 6 a 13 %, devido ao envolvimento do fatores nucleares dos hepatócitos (HNF) na sua regulação (Guengerich, 2015). Trata-se de uma isoforma que é induzida pelo fumo do tabaco e por alguns alimentos como, vegetais crucíferos, assados e grelhados.

Estudos anteriores mostraram que a CYP 1A2 é a isoforma de CYP450 mais envolvida na bioativação de carcinogéneos (Guengerich, 2015).

1.6.2.2. CYP450 isoforma 2D6

A CYP 2D6 é uma enzima expressa principalmente no fígado, rondando os 5 % das enzimas CYP450 totais presentes neste órgão. Esta isoforma foi a primeira a ser identificada enquanto enzima envolvida no metabolismo de fármacos e xenobióticos (Guengerich, 2015), incluindo antiarrítmicos, antidepressivos e tem uma relevância especial nos medicamentos analgésicos, como a codeína e o tramadol (Bibi, 2008).

1.6.2.3. CYP450 isoforma 3A4

A isoforma 3A4 da família CYP450 (CYP 3A4) é a enzima que desempenha a maior parte da metabolização de xenobióticos e outros compostos. Trata-se de uma isoforma que é expressa em vários tecidos como o fígado e o intestino, ambos locais de importância no que se refere ao metabolismo e absorção de drogas e xenobióticos, respectivamente. (Guengerich, 1999).

Dado que possui grande espectro de substratos, esta isoforma é a responsável pela biotransformação de mais de 60 % dos fármacos comercialmente disponíveis.

Estudos realizados mostraram que a expressão da CYP 3A4 é acentuadamente induzida tanto *in vivo* como *in vitro* em resposta a uma exposição de uma variedade de compostos (Lehmann *et al.*, 1998).

1.6.3. Apolipoproteína B100

A apolipoproteína B (Apo B) é uma proteína de extrema relevância no metabolismo das lipoproteínas. A Apo B possui 2 isoformas, a B48 e a B100 em que, a primeira é sintetizada no intestino enquanto a Apo B100 é sintetizada no fígado pelos hepatócitos (Fisher *et al.*, 1997; Welty *et al.*, 1999; Young, 1990)

A sua síntese ocorre principalmente com a formação da lipoproteína de muito baixa densidade (v LDL) entre outros componentes e, conforme é metabolizado à lipoproteína de baixa densidade (LDL) pelo organismo, a proteína Apo B100 funciona como ligando dos recetores hepáticos (recetores de LDL) para a captação e eliminação destas lipoproteínas pelo fígado ou pelo tecido extra-hepático (Young, 1990).

Doenças genéticas relacionadas com a Apo B100 como a hipercolesterolemia ou a deficiência em Apo B100 estão associados a elevados níveis de LDL acumulados na circulação sanguínea devido a mutações nos recetores de LDL ou na ligação ao recetor (Borén *et al.*, 1998).

As concentrações de Apo B100 e LDL no sangue são considerados fatores de risco e estão correlacionados diretamente com distúrbios cardíacos (Fisher *et al.*, 1997; Young, 1990).

1.6.4. Carboxilesterase 1

As Ces pertencem ao grupo das enzimas esterases de serina, responsáveis pela metabolização de substâncias em vários processos biológicos (Humerickhouse *et al.*, 2000; Redinbo, Bencharit, & Potter, 2003). Estas moléculas podem ser encontradas em várias espécies animais e em diferentes tecidos e convertem substratos a ácidos carboxílicos solúveis em água de modo a facilitar a sua eliminação no organismo (Fleming *et al.*, 2005; Humerickhouse *et al.*, 2000). As Ces 1 humanas são hidrolases de serina que abrangem vários substratos, clivam ésteres

pequenos, tioésteres e ligações de ésteres e amidas e a sua principal função aparenta ser a metabolização de xenobióticos. Contudo, esta enzima participa ainda na metabolização do colesterol e ácidos gordos no fígado e atua sobre a proteína C reativa retendo-a no interior do retículo endoplasmático antes de ser libertada para o sangue (Fleming *et al.*, 2005; Redinbo, Bencharit & Potter, 2003). A Ces 1 é sintetizada em vários tecidos / células tais como: intestino, rim, pulmões, coração, monócitos e macrófagos, sendo, no entanto, mais expressa no fígado onde tem maior impacto no metabolismo de xenobióticos e outros compostos endógenos tóxicos (Fleming *et al.*, 2005; Redinbo, Bencharit & Potter, 2003). Além destes, vários outros compostos são metabolizados pela Ces 1 tais como: cocaína, heroína, meperidina, demerol, lidocaína e também a lovastatina para a sua forma ativa (Redinbo, Bencharit & Potter, 2003).

1.6.5. Glucuronosiltransferase 1A1

As reações de fase II representam um mecanismo de destoxificação para uma grande variedade de xenobióticos. A conjugação com o ácido glucurónico, conhecido também como glucuronidação, é uma das reações da fase II que é realizada por uma família de enzimas denominadas UGTs (Iyer *et al.*, 1999; Rowland *et al.*, 2008). As UGTs são predominante expressas no fígado e convertem substratos a substâncias mais hidrofílicas facilitando a sua eliminação renal ou biliar (Iyer *et al.*, 1999; Marques & Ikediobi, 2010). Esta família divide-se em 2 famílias geneticamente diferentes, a UGT 1 e UGT 2 e subsequentemente nas subfamílias, UGT 1A, UGT 2A e UGT 2B (Marques & Ikediobi, 2010). A UGT 1A1 é a forma mais estudada devido à sua variabilidade genética e à sua relevância na eliminação metabólica da bilirrubina. A hiperbilirrubinemia e a encefalopatia são exemplos de doenças relacionadas com defeitos genéticos nesta isoforma (Fisher *et al.*, 2000).

2. Objetivos

A *S. divinorum*, mais especificamente o seu componente bioativo SA têm despertado um grande interesse na comunidade científica não só pelas suas características mas como também as suas propriedades únicas. Apesar de a SA ser uma substância com maior impacto no SNC, não se pode excluir os efeitos do consumo desta substância no sistema hepático pois até a atualidade não existe nenhum estudo sobre os potenciais efeitos que a SA poderá ter no sistema hepático. Dado que o seu consumo pelo mundo tem aumentando, principalmente na comunidade juvenil, as suas preocupações também aumentaram devido a sua segurança como consequências para o organismo.

Assim, com o presente estudo pretende-se avaliar em 2 linhas celulares consideradas modelos biológicos hepáticos nomeadamente a linha celular derivada de um adenocarcinoma hepático humano (Hep G2) e a linha celular humana hepática embrionária (WRL-68):

- os efeitos da SA ao nível da viabilidade celular destas células através de ensaios com brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT);
- os efeitos da SA ao nível da expressão hepática dos genes Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, 2D6, 3A4, Cit. C e UGT1A1, usando a técnica de PCR em tempo real.

3. Materiais e métodos

3.1. Compostos, soluções e meios de cultura

- 40 mM de ácido clorídrico (HCl) em isopropanol
- Agarose
- Água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC)
- Água ultrapura (desionizada e bidestilada)
- Azul de triptano (0,4 %)
- Clorofórmio
- DMSO
- Ditioneitol (DTT)
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* completo (DMEM-C)
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* incompleto (DMEM-I)
- Etanol 70%
- HCl 0,1 M
- Isopropanol
- L-Glutamina 200 mM
- Mistura de antibióticos (Penicilina-Streptomicina-Anfotericina B)
- MTT
- *Random hexamer mix*
- Reagente TRI
- Salvinorina A
- Solução de aminoácidos não-essenciais
- Solução de antibiótico e antimicótico
- Soro fetal bovino (FBS)
- *SYBR green*
- Tampão fosfato salino (PBS) 1X
- Tampão RT 10X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- Tampão Tris, acetato e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (TAE) 1X
- Transcriptase reversa
- Tripsina-EDTA 0,25 %

3.2. Equipamentos

- Câmara de fluxo laminar NUAIRE *Class II*
- Centrífuga Minispin Plus *Eppendorf*
- Centrífuga Sigma 3K18C
- Estufa NUAIRE DHD *Autoflow CO₂ Air-Jacketed incubator*
- Hemocitómetro ou câmara de Neubauer
- *iCycler* acoplado com um *iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System*
- Nanoespectrofotômetro Implen *Nanophotometer*
- Leitor espectrofotométrico de microplacas EZ Read 400
- Microscópio ótico composto Olympus CK40

3.3. Linhas Celulares

3.3.1. Hep G2

Trata-se de uma linha celular derivada de um adenocarcinoma hepático humano, Hep G2, cujas células foram isoladas a partir de um indivíduo caucasiano do sexo masculino com 15 anos de idade (Aden *et al.*, 1979). Dada a sua origem humana e por permanecerem com atividade metabólica de xenobióticos, esta linha celular tem sido amplamente utilizada enquanto modelo biológico em estudos farmacológicos e toxicológicos (Cemazar *et al.*, 2009).

As células Hep G2 em condições ótimas de crescimento devem ser mantidas numa incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂. O meio de cultura usado foi o DMEM-C, suplementado com 10 % de FBS, 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL streptomina e 0,25 µg/mL de anfotericina B.

3.3.2. WRL-68

A linha celular humana hepática embrionária, WRL-68, foi patenteada em 1976 por Apostolov com a designação de células humanas epiteliais do fígado. Estas células apresentam uma morfologia muito semelhante à dos hepatócitos humanos, pelo que podem servir de modelo de estudo da função dos hepatócitos *in vitro* (Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 1994).

A linha celular WRL-68 em condições ótimas de crescimento deve ser mantida numa incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂ e deve ser mantida com meio de cultura DMEM-C suplementado com 10 % FBS, 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL streptomina e 0,25 µg/mL de anfotericina B.

3.4. Culturas celulares

Para garantir a esterilização da zona de trabalho ligava-se sempre a lâmpada de UV da câmara de fluxo laminar por um período de 15 min anteriormente à sua utilização. Após este processo de esterilização ligava-se o fluxo vertical, a luz do interior da câmara e subia-se o vidro da câmara até ao limite indicado, aguardando 5 min para garantir a estabilização do fluxo laminar da câmara. De seguida, todo o interior da câmara de fluxo laminar era borrifado com etanol 70 % e limpa toda a área de trabalho no seu interior.

Todos os materiais e equipamentos dentro da sala de cultura eram sempre manipulados com luvas e, antes de iniciar o trabalho, todas as soluções eram pré-aquecidas num banho a 37 °C e, após este período, todo o material a colocar no interior da câmara era borrifado com etanol 70 %.

No decorrer do manuseamento e tratamento das culturas celulares, teve-se sempre o especial cuidado de não passar com qualquer objeto por cima de soluções, frascos de cultura ou tubos abertos, sob pena das culturas celulares ficarem contaminadas. Além disso, durante o seu manuseamento, as tampas destes materiais eram colocadas voltadas para baixo pelo mesmo motivo.

Após o término da manipulação das células no interior da câmara de fluxo laminar, caso o sistema de aspiração automático tenha sido utilizado, o mesmo era lavado com uma solução de lixívia e despejado o reservatório de resíduos. Além disso, todo o material utilizado era sempre descartado nos recipientes apropriados, limpa toda a área interior da câmara com etanol 70 %, fechada a câmara e desligada. No final, a lâmpada de UV era ligada por um período de 15 min de modo a assegurar a existência de condições de esterilidade no interior da câmara de fluxo laminar para o utilizador seguinte.

3.4.1. Caracterização e preparação dos meios de cultura

A composição dos meios de cultura é crucial para o crescimento e manutenção de culturas celulares. Existem inúmeras linhas celulares e nem todas possuem as mesmas características de crescimento pelo que existem disponíveis, uma diversidade de meios de cultura com diferentes constituições. Normalmente os meios de cultura são compostos pelos constituintes básicos ao crescimento celular (aminoácidos, água, hidratos de carbono, lípidos, sais inorgânicos e suplementos), ainda que com concentrações variáveis, podendo ser suplementados, em particular com FBS, o qual apresenta na sua composição fatores de crescimento, fatores de adesão celular, albumina, anti-proteases e transportadores do ião Fe^{3+} , entre outros constituintes, os quais são cruciais para o crescimento celular.

Os meios usados no presente estudo foram os meios de cultura DMEM-C e DMEM-I.

3.4.2. Descongelamento e contagem de células

Para cada uma das linhas celulares incluídas no estudo, uma alíquota de células preservada em azoto líquido, e contendo 1×10^6 células, foi descongelada num banho a 37 °C durante aproximadamente 10 min, período após o qual o seu conteúdo foi transferido para um tubo de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura apropriado. A suspensão foi centrifugada a 1250 rotações por minuto (rpm) durante 4 min, após a qual, o sobrenadante foi descartado e ressuspensionado o *pellet* em 1 mL de DMEM-C completo. De seguida, procedeu-se à contagem de células e foi transferido um volume da suspensão correspondente a 1×10^6 células para um frasco de cultura de 25 cm² contendo 5 mL de DMEM-C. O frasco foi devidamente identificado com a identificação da linha celular, número da passagem da cultura, o acrónimo do utilizador e a data.

Para a contagem celular, após a ressuspensão do *pellet* de células em 1 mL de meio de cultura, foram retirados 10 µL da suspensão celular para um microtubo, ao qual foram adicionados 10 µL de azul tripano 0,4 %. De seguida, 10 µL da suspensão anterior foram colocados numa câmara de Neubauer ou hemocitómetro e procedeu-se à contagem do número de células viáveis num microscópio ótico composto, em cada um dos 4 quadrantes do hemocitómetro. Pelo facto do azul de tripano ser um corante, as células viáveis não o incorporam pelo que visualmente apresentam uma tonalidade mais brilhante e não azul. Para determinar a concentração de células presente na amostra foi aplicada a seguinte fórmula:

nº de células = média das células por quadrante x 10^4 x 2 x volume de ressuspensão das células

3.4.3. Tripsinização

A tripsinização é um procedimento que recorre à utilização de tripsina para permitir a dissociação das células aderentes em crescimento do material de plástico onde se encontram em cultura. Este procedimento foi aplicado sempre que as culturas celulares atingiram uma confluência de cerca de 90 - 95 %. Anteriormente à adição da tripsina, o meio de cultura presente nos frascos de cultura foi aspirado tendo, de seguida sido lavados com PBS 1X. Após este passo, o PBS 1X foi aspirado e adicionada a solução de tripsina-EDTA 0,25 %, deixando-se a atuar por um período de aproximadamente 5 min na estufa a 37 °C, período após o qual se auxiliava o processo de dissociação através de ligeiras pancadas secas nos frascos de cultura.

O volume de tripsina a incubar com as culturas celulares diferiu de acordo com a área, sendo utilizados: para um frasco de cultura de 25 cm² usou-se 2 mL, 4 mL nos frascos de cultura de 75 cm² e 8 mL em frascos de cultura de 175 cm².

Para parar a reação da tripsina, após as células se encontrarem em suspensão no frasco de cultura, adicionou-se duas vezes o volume de meio de cultura completo à suspensão e transferiu-se a todo o volume para um tubo de 15 mL ou 50 mL, tendo-se centrifugado a 1250

rpm durante 5 min. No final, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM-C. Após este passo, procedeu-se à contagem do número de células para sua posterior utilização.

Ao longo deste trabalho foram descongelados tubos de criopreservação contendo cada uma das linhas celulares em estudo, Hep G2 e WRL-68. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² em meio de cultura apropriado com soro e, após atingirem uma confluência de 90 - 95 % foram tripsinizadas e colocadas num frasco de 75 cm² até atingirem uma confluência semelhante à anterior, sendo posteriormente colocadas num frasco de cultura de 175 cm². Em ambas as linhas celulares, neste procedimento foram feitas passagens de 1:4 a 1:6.

Quando as culturas celulares atingiram a densidade desejada, as mesmas foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 e de 6 poços, para serem posteriormente incubadas com o composto em estudo e utilizadas nos protocolos de MTT e para extração de ácido ribonucleico (RNA) total. Nas placas de cultura celular de 96 poços para a realização dos ensaios de MTT, foram colocados em cada 2,5 x 10⁴ células por poço. Nas placas de cultura celular de 6 poços utilizadas posteriormente para a extração de RNA e posterior análise de expressão de genes foram adicionadas 4 x 10⁵ células por poço.

3.4.4. Criopreservação

O congelamento celular é um procedimento experimental através do qual se possibilita a criopreservação de linhas celulares. Ao longo do presente trabalho, este foi um procedimento realizado diversas vezes. Após a determinação do número de células, retirou-se o volume equivalente a 1 x 10⁶ células e colocou-se no interior de um criotubo, perfazendo-se o volume de 1 mL com DMEM-C, com 10% de DMSO. Cada tubo de criopreservação, ou criotubo, foi identificado (designação da linha celular, número da passagem da cultura, nome do utilizador e data de criopreservação) e colocado durante 2 a 4 horas a -20 °C, tendo sido posteriormente colocado a -80 °C durante 2 a 3 dias e finalmente colocado em azoto líquido.

3.5. Incubação das células com o composto

3.5.1. Preparação das soluções de salvinorina A

A solução *stock* de SA foi preparada em 1 mL de DMSO e 1 µL de HCl 0,1 M, numa concentração de 2,312 mM. A partir desta solução *stock* de SA foram preparadas soluções sucessivas com diferentes concentrações para os ensaios a realizar: 50 µM, 10 µM, 1 µM e 0,1 µM. Todas as soluções de trabalho foram preparadas em meio de cultura DMEM-I.

3.5.2. Incubação

A incubação das células com as soluções de SA foram realizadas em placas de cultura de 96 poços (ensaio de MTT) e de 6 poços (extração de RNA total) e sempre que as culturas atingiram a confluência desejada (90 - 95 %).

As incubações foram sempre precedidas de um período de 12 h de incubação das células com meio de cultura apropriado a cada linha celular, incompleto, ou seja, sem FBS 10 %. Após este período, o meio de cultura foi aspirado e as culturas celulares foram incubadas com SA previamente preparado em meio de cultura incompleto apropriado à linha celular, e pré-aquecido a 37 °C, nas concentrações e durante os períodos de tempo em estudo.

As concentrações de SA e períodos de incubação incluídos no estudo de citotoxicidade foram: 0, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM e 50 µM durante 12, 24, 36, 48 e 72 h.

As concentrações de SA e períodos de incubação incluídos no estudo de regulação da expressão de genes foram: 0 e 1 µM durante 12 h, 24 h e 72 h para ambas as linhas celulares (Hep G2 e WRL-68).

3.6. Ensaio MTT

3.6.1. Fundamento teórico

O ensaio de MTT é um ensaio espectrofotométrico que permite avaliar a viabilidade e a proliferação celular em ensaios *in vitro* de uma população celular em resposta a um determinado fator externo. A redução do MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) é amplamente aceita na comunidade científica como sendo um procedimento viável para avaliar a atividade metabólica de uma cultura celular. O MTT, de coloração amarela, é reduzido a formazano pelas células metabolicamente ativas por ação das enzimas desidrogenases mitocondriais e agentes redutores. A formação do formazano intracelular, de coloração roxa ou azulada, podendo ser solubilizado e quantificado por espectrofotometria.

A redução do MTT apenas ocorre nas células viáveis, as quais, são capazes de reduzir o MTT em formazano, permitindo a sua quantificação e servindo como medida para avaliar a sua proliferação e viabilidade celular.

3.6.2. Protocolo experimental

Após o período de exposição das linhas celulares ao composto em estudo, aspirou-se o meio de cultura e lavaram-se os poços contendo as células com PBS 1X pré-aquecido a 37 °C. Na ausência de luz adicionaram-se a cada poço 150 µL de MTT 0,5 mg/mL e incubaram-se as placas sob atmosfera húmida com 5 % de CO₂ a 37 °C durante 1 a 2 h. Após este período de incubação com a solução de MTT, a mesma foi aspirada e adicionaram-se 150 µL de 40 mM HCl em isopropanol

para a solubilização dos cristais de formazano formados, tendo-se auxiliado o processo através da ressuspensão da solução com uma micropipeta. Posteriormente, todo o conteúdo dos poços foi transferido para uma nova placa de 96 poços e de seguida procedeu-se à leitura da sua absorvância num espectrofotómetro de microplacas a 570 nm.

Cada ensaio foi feito em triplicado, no mínimo, e foram realizados três ensaios independentes.

3.7. RNA total

3.7.1. Extração de RNA total

Após a incubação de ambas as linhas celulares, Hep G2 e WRL-68, com as soluções de SA durante cada período de incubação incluído no estudo, o meio de cultura as células foi descartado e os poços contendo as células foram lavados com PBS 1X frio. Adicionou-se reagente TRI (500 µL/poço) a cada um dos poços e com auxílio de um *cellscraper* (raspador) desaderiram-se as células do fundo dos poços e a suspensão resultante foi transferida para microtubos de 1,5 mL previamente identificados, os quais foram armazenados a -80 °C.

No final de cada experiência, ou seja, aquando da recolha de todas as suspensões celulares de todos os tempos de incubação testados, as amostras foram descongeladas sobre gelo e adicionaram-se 200 µL de clorofórmio a cada microtubo, homogeneizando-se vigorosamente a mistura e deixando-se incubar durante 5 min à temperatura ambiente. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 14 000 rpm durante 25 min a 4 °C e, findo este período, observou-se a formação de três fases em cada microtubo: fase orgânica com cor rosa que contém proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio; uma interfase contendo o DNA; e, por último, a fase aquosa (transparente) que contém o RNA.

A fase aquosa foi recolhida para um novo microtubo previamente identificado ao qual se adicionaram 750 µL de isopropanol gelado, tendo-se, de seguida, homogeneizado a solução por inversão e incubado a -20 °C durante 15 min para permitir a precipitação do RNA total presente na solução. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 14 000 rpm durante 25 min a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e o RNA sob a forma de um precipitado de cor branca, foi lavado com 1 mL de etanol 70 % em água DEPC gelado. As amostras foram centrifugadas a 14 000 rpm durante 10 min a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e dissolveu-se o RNA (*pellet*) em água DEPC (20 µL/ependorf). As amostras foram de seguida quantificadas e armazenadas a -80 °C.

3.7.2. Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total foi realizada por espectrofotometria. Este equipamento fornece diretamente a concentração de RNA total (µg/µL) e a razão A_{260}/A_{280} , a qual fornece uma indicação do grau de pureza do RNA total, que deverá situar-se 1,8 e 2,1.

O grau de integridade do RNA total extraído foi ainda confirmado por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE 1X, na qual o volume equivalente a 1 µg de RNA total extraído de cada amostra foi aplicada no gel, deixando que a reação decorresse por cerca de 30 min a 90 V (migração das amostras do ânodo para o cátodo), e observando no final, no transiluminador, a formação das duas bandas características do RNA total (28S e 18S).

3.8. Síntese de cDNA

Para a preparação de cDNA é necessário realizar uma transcrição reversa do RNA por ação da transcriptase reversa. Assim, a 1 µg de RNA total foi adicionada uma uma mistura de reação (20 µL) contendo tampão RT 10X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), *random hexamer* mix (125 ng/µL), 0,5 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). Os tubos foram colocados num termociclador e foi efetuado um RT-PCR com o seguinte programa: 5 min a 65 °C, seguido de um período indeterminado a 4 °C para permitir a adição de 3 µL de solução contendo 0,1 M de DTT e 200 U/µL de transcriptase reversa, após a qual se prosseguiu o programa com 60 min a 37 °C, seguidos de 5 min a 75 °C para haver a inativação da enzima. O cDNA foi recolhido e armazenado a -20 °C para posterior utilização.

3.9. PCR em tempo real

A análise da expressão dos genes em estudo - Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, 2D6, 3A4, Cit. C e UGT 1A1, foi realizada por PCR em tempo real nas células Hep G2 e WRL-68 após incubação com 0 e 1 µM de SA durante 12, 24 e 72 h. O gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como gene endógeno para normalizar os níveis de expressão dos genes em estudo (controlo). As sequências dos *primers* utilizados no PCR estão indicados na tabela 2. Foram utilizadas as condições de preparação da reação indicadas na tabela 3 num volume de reação de 20 µL e segundo as condições de amplificação ótimas determinadas para cada linha celular e para cada gene em estudo descritas na tabela 4.

As condições foram otimizadas tendo-se testado e otimizado a eficiência dos *primers* para cada um dos genes com diluições de cDNA (1:1; 1:10 e 1:100).

Todas as reações foram realizadas num termociclador *iCycler* acoplado com um *iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* e a emissão de fluorescência do *SYBR green* foi determinada após cada ciclo e a quantidade relativa de mRNA amplificado quantificada usando o *software* *iCycler*.

Cada experiência foi realizada em triplicado e os dados recolhidos e analisados resultaram de três experiências independentes.

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

Tabela 2. Sequência dos *primers* usados no PCR em tempo real.

| Primer | Sequência 5'- 3' |
|--------------|--------------------------------|
| hApo B100 fw | atc cac atc acct cc aaa gc |
| hApo B100 rv | ctg agg ctg tcc aca ctg aa |
| hCes 1 fw | gca tct ggg gat tct tca gc |
| hCes 1 rv | ttc tcc tcc cgc tga ctc tc |
| hCit. C fw | cct cag gga gag gtg gct tt |
| hCit. C rv | agc cca agc aaa gag gga ac |
| hCYP 1A2 fw | ctg ggc act tcg acc ctt ac |
| hCYP 1A2 rv | gca gga ac caca gga acc tc |
| hCYP 2D6 fw | tct ctt gga caa agc cgt ga |
| hCYP 2D6 rv | gct ggg ata tgc agg agg ac |
| hCYP 3A4 fw | ccg agt gga ttt cct tca gc |
| hCYP 3A4 rv | agg tgg gtg gtg cct tat tg |
| hGAPDH fw | cgc cag ccg agc cac atc |
| hGAPDH rv | cgc cca ata cga cca aat ccg |
| hUGT 1A1 fw | cct tgc ctc aga att cct tc |
| hUGT 1A1 rv | att gat ccc aaa gag aaa acc ac |

Tabela 3. Condições de reação usadas no PCR em tempo real para cada gene (Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, Cit. C, GAPDH and UGT 1A1) em cada uma das linhas celulares (Hep G2 e WRL-68).

| Gene | Condições de reação |
|---------------|--|
| Hep G2 | |
| hApo B100 | 10 µL SYBR green, 3 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hCes 1 | 10 µL SYBR green, 3 pmol primer fw e rv; 1,5 µL cDNA |
| hCit. C | 10 µL SYBR green, 2 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hCYP 1A2 | 10 µL SYBR green, 2,5 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hCYP 2D6 | 10 µL SYBR green, 3 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hCYP 3A4 | 10 µL SYBR green, 3 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hGAPDH | 10 µL SYBR green, 3 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hUGT 1A1 | 10 µL SYBR green, 5 pmol primer fw e rv; 1,5 µL cDNA |
| WRL-68 | |
| hApo B100 | 10 µL SYBR green, 4 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hCes 1 | 10 µL SYBR green, 3 pmol primer fw e rv; 1,5 µL cDNA |
| hCit. C | 10 µL SYBR green, 3 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hCYP 1A2 | 10 µL SYBR green, 4 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hCYP 2D6 | 10 µL SYBR green, 3 pmol primer fw e rv; 1 µL cDNA |
| hCYP 3A4 | 10 µL SYBR green, 4 pmol primer fw e rv; 1,5 µL cDNA |
| hGAPDH | 10 µL SYBR green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA |
| hUGT 1A1 | 10 µL SYBR green, 5 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA |

Tabela 4. Condições de amplificação usadas no PCR em tempo real para cada gene (Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, Cit. C, GAPDH and UGT 1A1) em cada uma das linhas celulares (Hep G2 e WRL-68).

| Gene | Condições de amplificação |
|---------------|--|
| Hep G2 | |
| hApo B100 | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCes 1 | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 64 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCit. C | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCYP 1A2 | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCYP 2D6 | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCYP 3A4 | 3 min a 95 °C; 45 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hGAPDH | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hUGT 1A1 | 3 min a 95 °C; 45 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 60 °C; 30 sec a 72 °C) |
| WRL-68 | |
| hApo B100 | 3 min a 95 °C; 45 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 60 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCes 1 | 3 min a 95 °C; 45 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCit. C | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCYP 1A2 | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCYP 2D6 | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hCYP 3A4 | 3 min a 95 °C; 45 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hGAPDH | 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| hUGT 1A1 | 3 min a 95 °C; 45 ciclos (15 sec a 95°C; 30 sec a 60 °C; 30 sec a 72 °C) |

3.9. Tratamento Estatístico

A percentagem relativa de viabilidade celular (% CV) após incubação das células com SA foi calculada a partir das absorvâncias obtidas após a realização dos ensaios de MTT de acordo com a seguinte expressão:

$\% CV = (\text{média da absorvâncias após incubação com o composto} / \text{média das absorvâncias dos controlos}) \times 100.$

Estes valores foram comparados com células incubadas com 0 μM de SA (controlo) usando o teste *t*-Student, no qual se avaliou a existência de diferenças significativas em termos de viabilidade celular entre controlos e células expostas ao composto em estudo. Os valores foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$ (*).

Os dados recolhidos no PCR em tempo real foram analisados através do método de Pfaffl: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001), que permite determinar as diferenças nos níveis de expressão entre o controlo e células tratadas tendo em conta as eficiências das reações e o gene de referência

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

GAPDH. Os dados obtidos foram tratados através da realização de testes *t*-Student considerando um resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$ (*).

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação da citotoxicidade da Salvinorina A

Conforme o objetivo do presente trabalho, as células Hep G2 e WRL-68 foram incubadas com SA de modo a avaliar o efeito que este composto tem na viabilidade e proliferação celulares destas células.

Com base em estudos realizados anteriormente pelo grupo, definiram-se as concentrações e tempos de incubação a analisar: 0, 0,1, 1, 10 e 50 μM de SA e períodos de incubação de 12, 24, 36, 48 e 72 h. Os resultados obtidos estão representados e descritos nas tabelas e figuras seguintes.

Tabela 5. Viabilidade celular relativa (%) das células Hep G2 após incubação com 0, 0,1, 1, 10 e 50 μM de SA durante 12, 24, 36, 48 e 72 h. Os valores apresentados correspondem à média da percentagem nas experiências realizadas \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

| Tempo de incubação (h) \ Concentração (μM) | 12 | 24 | 36 | 48 | 72 |
|---|-----------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|
| 0 (controlo) | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| 0,1 | 89,4 \pm 10,0 | 92,9 \pm 9,3 | 92,5 \pm 5,6 | 101,5 \pm 14,9 | 95,0 \pm 9,7 |
| 1 | 94,8 \pm 9,4 | 92,2 \pm 4,6 | 100,3 \pm 8,3 | 106, \pm 2,8 | 97,7 \pm 8,6 |
| 10 | 91,5 \pm 11,6 | 94,2 \pm 9,9 | 98,7 \pm 3,6 | 92,5 \pm 7,7 | 66,1 \pm 12,6* |
| 50 | 86,3 \pm 6,7 | 88,6 \pm 8,7 | 99,9 \pm 7,0 | 88,7 \pm 5,2 | 65,3 \pm 6,2* |

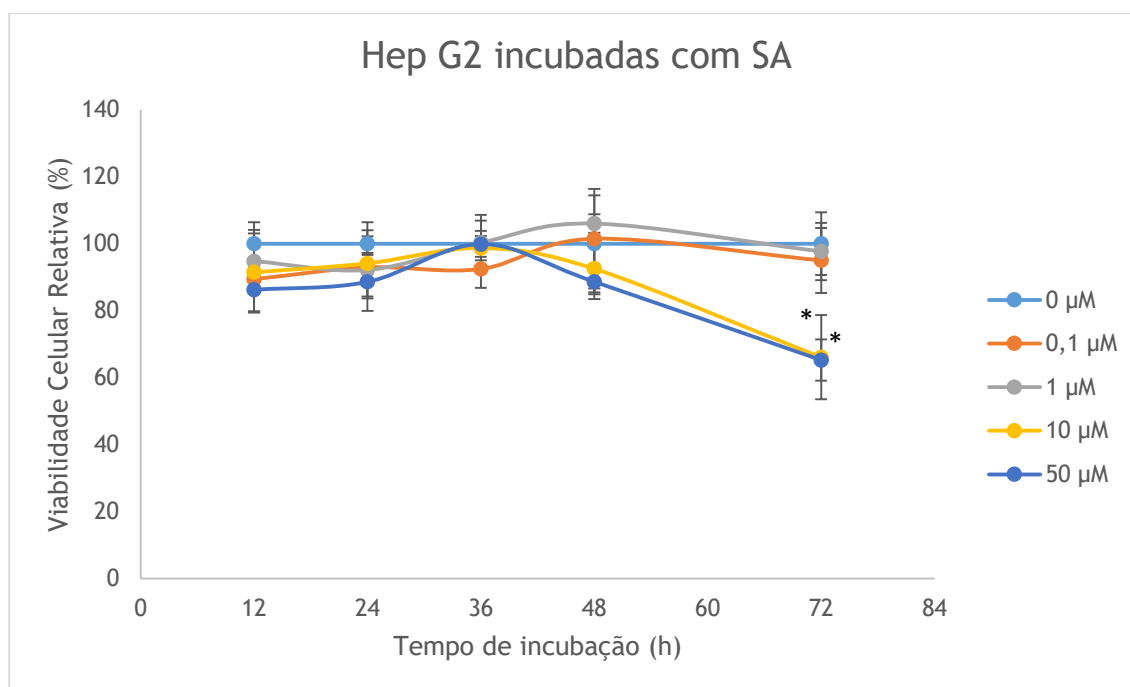


Figura 3. Gráfico da viabilidade celular relativa (%) das células Hep G2. Os valores apresentados correspondem à média da percentagem nas experiências realizadas \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

Como pode observar-se na tabela 5 e figura 3, respeitantes à incubação das células Hep G2 com SA, verificou-se que as concentrações mais elevadas nomeadamente, 10 e 50 μM , promoveram uma diminuição significativa na sua viabilidade celular relativa após 72 h de incubação.

Conforme se pode observar nas mesmas, a incubação destas células com 0,1 e 1 μM de SA não afetou a viabilidade celular para qualquer um dos tempos de incubação estudados. Além disso, o tempo de incubação das Hep G2 com o composto é de extrema importância na medida em que a sua viabilidade celular apenas é afetada para períodos de incubação superiores a 48 h, e para as concentrações de 10 e 50 μM de SA.

No geral, estes resultados são concordantes com os por Martinho *et al.* (2015) (Martinho, Silva, & Gallardo, 2015) após a incubação da mesma linha celular com SA. De facto, os autores observaram um decréscimo na viabilidade celular para as mesmas concentrações, mas para períodos de incubação inferiores (logo após 12 h de incubação).

Uma possível justificação para as diferenças encontradas entre os dois estudos realizados com a mesma linha celular pode residir no facto de ambos terem sido conduzidos com as células em números de passagem de cultura distintos o que pode de alguma forma afetar a sensibilidade das mesmas para o mesmo composto. Ainda assim, no geral, a conclusão geral retirada de ambos os estudos é semelhante na medida em que em ambos se pode concluir que 50 μM de SA é efetivamente uma concentração citotóxica para as células Hep G2.

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvignorina A na expressão hepática de genes

Tabela 6. Viabilidade celular relativa (%) das células WRL-68 após incubação com 0, 0,1, 1, 10 e 50 μM de SA durante 12, 24, 36, 48 e 72 h. Os valores apresentados correspondem à média da percentagem nas experiências realizadas \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

| Tempo de incubação (h) \ Concentração (μM) | 12 | 24 | 36 | 48 | 72 |
|---|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 0 (controlo) | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| 0,1 | 100,1 \pm 10,3 | 98,2 \pm 10,0 | 104,5 \pm 6,9 | 105,1 \pm 7,1 | 117,2 \pm 3,1 |
| 1 | 103,2 \pm 8,7 | 93,9 \pm 5,9 | 107,4 \pm 9,7 | 101,8 \pm 11,5 | 114,3 \pm 4,0 |
| 10 | 97,7 \pm 6,5 | 87,9 \pm 9,1 | 99,8 \pm 5,1 | 94,3 \pm 9,3 | 105,5 \pm 2,5 |
| 50 | 88,8 \pm 5,1 | 69,5 \pm 6,0* | 63,7 \pm 5,5* | 50,0 \pm 4,5* | 49,7 \pm 2,1* |

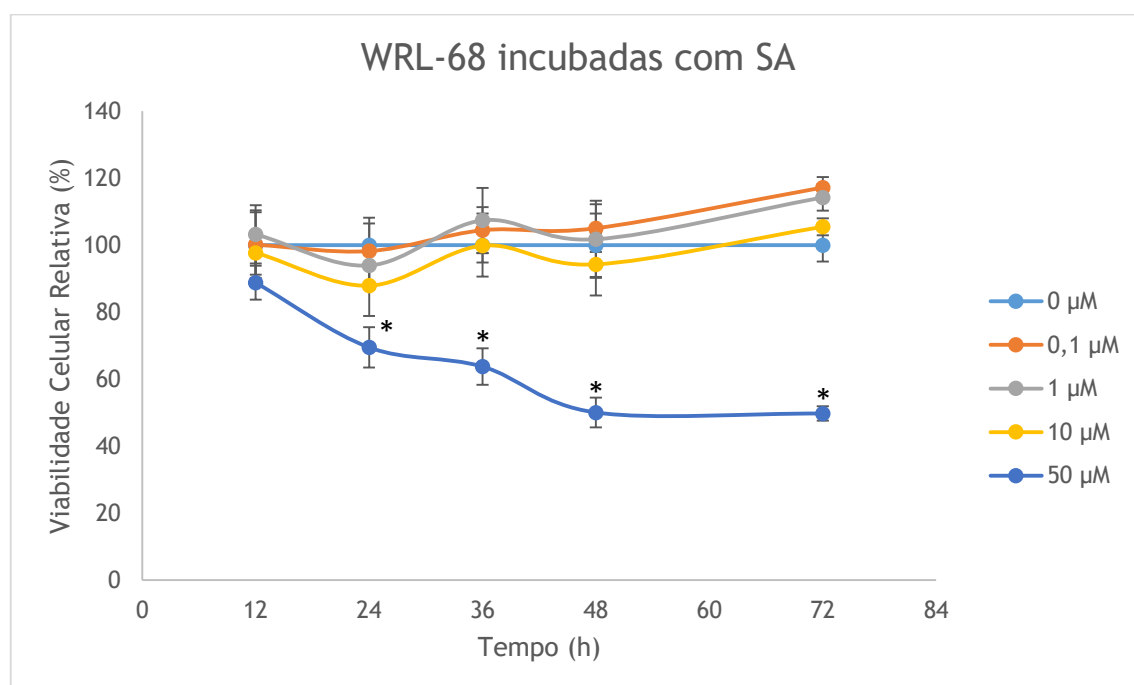


Figura 4. Gráfico da viabilidade celular relativa (%) das células WRL-68. Os valores apresentados correspondem à média da percentagem nas experiências realizadas \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

Com base nos resultados da tabela 6 e figura 4, respeitantes à exposição da linha celular WRL-68 a várias concentrações de SA, podemos observar que as concentrações 0,1, 1 e 10 μM não apresentaram qualquer efeito na viabilidade celular para qualquer dos períodos de incubação testados. Contudo, na incubação destas células com a concentração mais elevada de SA, 50 μM , observou-se uma diminuição na viabilidade celular relativa para períodos de incubação superiores a 12 h, tendo diminuído para 69,5 \pm 6,0 %, 63,4 \pm 5,5 %, 50,0 \pm 4,5 % e 49,7 \pm 2,1 % para períodos de incubação de 24, 36, 48 e 72 h, respetivamente.

Em geral, dos resultados obtidos observou-se que 50 μM de SA são citotóxicas para ambas as linhas celulares estudadas em particular para períodos de incubação mais longos. Pelo contrário, 10 μM parecem promover uma diminuição da viabilidade celular apenas nas células Hep G2, indicando que estas células são mais sensíveis à exposição ao composto a 10 μM .

Pelos resultados obtidos para a incubação das células com as concentrações mais baixas de SA, 0,1 e 1 μM , para qualquer uma das linhas celulares, Hep G2 e WRL-68, observou-se que estas não afetaram a sua viabilidade celular relativa, podendo concluir-se que estas concentrações de SA não induzem qualquer citotoxicidade nestas linhas celulares.

Ainda, pelos resultados obtidos, foi também possível verificar que as células WRL-68 parecem ter uma considerável resistência ao composto, comparativamente com as Hep G2, na medida em que se observaram menos interferências na viabilidade celular destas células e, quando observadas, as mesmas foram, de um modo geral, de menor impacto em termos percentuais.

Estudos realizados anteriormente têm indicado que a SA apresenta baixa toxicidade (Martinho, Silva & Gallardo, 2015; Mowry, Mosher, & Briner, 2003). Siebert *et al.* (1994) demonstrou que o consumo de 200 a 500 μg de SA são suficientes para atingir os intensos efeitos psicoativos (Siebert, 1994).

Com base nisto, e considerando que a percentagem de SA presente por grama de folhas frescas de *S. divinorum* é de aproximadamente 0,2 % (Shirota, Nagamatsu & Sekita, 2006), podemos inferir que 10 μM de SA contêm 432 μg de SA e 50 μM 2 160 μg SA, o que equivale, em termos de *S. divinorum*, a 216 μg e 1,08 g, respetivamente. Ou seja, de acordo com os resultados obtidos a partir deste estudo *in vitro*, a concentração mais citotóxica é a de o que equivale a aproximadamente 1 g de SA, a qual já se encontra fora dos intervalos de consumo habituais.

4.2. Avaliação da expressão de genes

A análise da expressão hepática dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, 2D6, 3A4 e UGT 1A1 nas linhas celulares Hep G2 e WRL-68 após a sua incubação com 0 e 1 μM de SA durante 12, 24 e 72 h foi feita por PCR em tempo real, o qual permite analisar diferenças entre níveis de expressão génica. O gene GAPDH foi usado como controlo endógeno para normalizar os níveis de expressão dos genes em estudo.

Apesar de 10 μM de SA apenas induzir citotoxicidade nas células Hep G2 após 72 h de incubação, optou-se por excluir esta concentração nos estudos de expressão hepática de genes em qualquer das linhas celulares estudadas, de modo a possibilitar a sua análise, sempre partindo do princípio que as diferenças observadas na expressão de mRNA dos genes estudados se deve à incubação das células com o composto e não a um possível efeito resultante da sua própria toxicidade.

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

Tabela 7. Expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas células Hep G2. Os valores apresentados correspondem à média da expressão relativa \pm desvio-padrão após a incubação com 0 e 1 μ M de SA durante 12, 24, 72 h e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

| Gene | Tempo de incubação (h) | | 12 | 24 | 72 |
|----------|-------------------------|--|----------------|----------------|----------------|
| | Concentração (μ M) | | | | |
| Apo B100 | 0 (controlo) | | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | | 1,3 \pm 0,0* | 1,0 \pm 0,0 | 0,8 \pm 0,1 |
| Ces 1 | 0 (controlo) | | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | | 1,1 \pm 0,3 | 1,2 \pm 0,0* | 1,1 \pm 0,4 |
| Cit. C | 0 (controlo) | | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | | 2,3 \pm 0,1* | 0,4 \pm 0,1* | 1,1 \pm 0,5 |
| CYP 1A2 | 0 (controlo) | | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | | 2,9 \pm 0,8* | 0,4 \pm 0,2* | 0,6 \pm 0,1* |
| CYP 2D6 | 0 (controlo) | | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | | 3,3 \pm 0,4* | 0,4 \pm 0,1* | 1,0 \pm 0,5 |
| CYP 3A4 | 0 (controlo) | | 1,0 \pm 0,1 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | | 1,2 \pm 0,2 | 0,8 \pm 0,1* | 0,4 \pm 0,0* |
| UGT 1A1 | 0 (controlo) | | 1,0 \pm 0,1 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | | 1,2 \pm 0,5 | 1,9 \pm 0,4* | 0,6 \pm 0,2* |

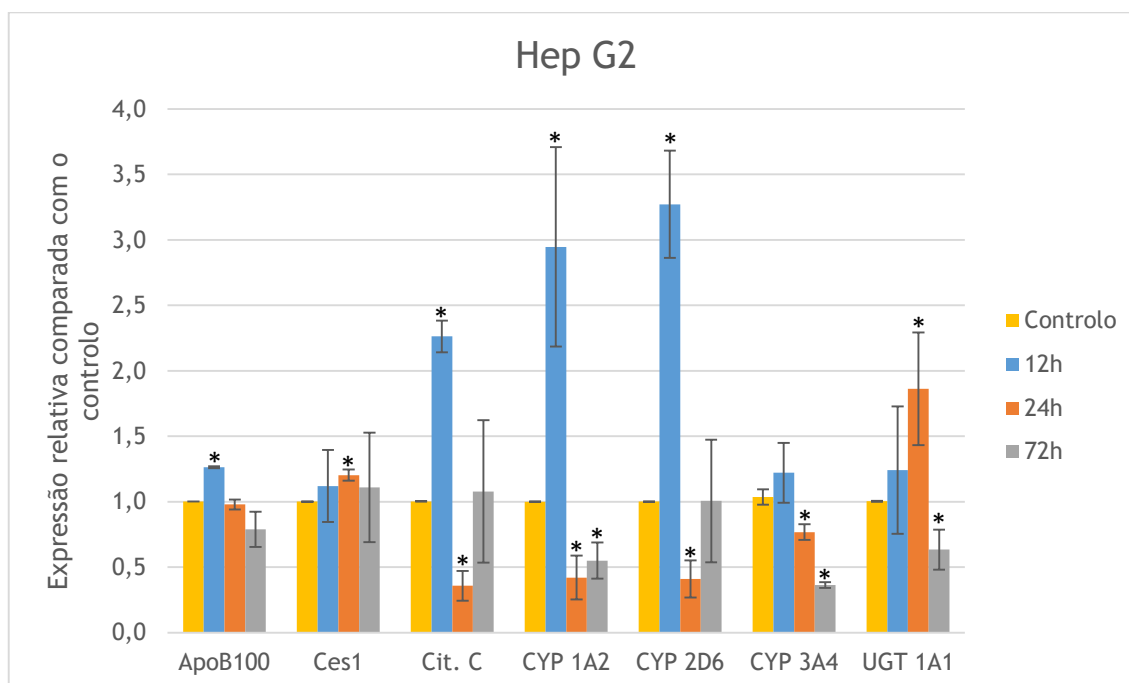


Figura 5. Gráfico da expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas células Hep G2. Os valores apresentados correspondem à média da expressão relativa \pm desvio-padrão após a incubação com 0 e 1 μ M de SA durante 12, 24, 72 h e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

Com base no exposto anteriormente, e de acordo com os dados fornecidos pela tabela 7 e figura 5, observou-se que na linha celular Hep G2, a incubação com 1 μM de SA promoveu um ligeiro aumento na expressão de Apo B100 ($1,3 \pm 0,0$) e Ces 1 ($1,2 \pm 0,0$) após 12 h e 24 h, respetivamente, de incubação com o composto, retornando para os seus níveis basais em tempos de incubação superiores.

Em relação à expressão de mRNA de Cit. C nas mesmas células observou-se um significativo aumento na sua expressão logo após 12 h de incubação com o composto ($2,3 \pm 0,1$), tendo sido contrariado após 24 h ($0,4 \pm 0,1$) e retornado para níveis basais após 72 h de incubação com SA.

No que respeita à expressão das isoformas do CYP450 observaram-se algumas variações ao longo dos tempos de incubação estudados sendo que: após 12 h foi observado um aumento na expressão relativa de mRNA da CYP 1A2 ($2,9 \pm 0,8$) e CYP 2D6 ($3,3 \pm 0,4$); após a incubação de 24 h foi observada uma diminuição da expressão para todas as isoformas, em particular da CYP1A2 e da CYP 2D6 (CYP 1A2: $0,4 \pm 0,2$; CYP 2D6: $0,4 \pm 0,1$; CYP 3A4: $0,8 \pm 0,1$); e, após 72 h de incubação observou-se a manutenção de níveis de expressão reduzidos (comparativamente com o controlo) apenas nas isoformas 1A2 e 3A4, $0,6 \pm 0,1$ e $0,4 \pm 0,0$, respetivamente.

Por último, no que se refere à expressão relativa de mRNA da UGT 1A1 observou-se um aumento significativo da sua expressão após 24 h de incubação com 1 μM de SA ($1,9 \pm 0,4$) seguido de um decréscimo bastante significativo às 72 h ($0,6 \pm 0,2$).

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

Tabela 8. Expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas células WRL-68. Os valores apresentados correspondem à média da expressão relativa \pm desvio-padrão após a incubação com 0 e 1 μ M de SA durante 12, 24, 72 h e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

| Gene | Tempo de incubação (h) | 12 | 24 | 72 |
|----------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | Concentração (μ M) | | | |
| Apo B100 | 0 (controlo) | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | 1,5 \pm 0,4* | 1,0 \pm 0,00 | 1,3 \pm 0,1 |
| Ces 1 | 0 (controlo) | - | - | - |
| | 1 | - | - | - |
| Cit. C | 0 (controlo) | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | 0,6 \pm 0,0* | 2,0 \pm 0,3* | 0,5 \pm 0,0* |
| CYP 1A2 | 0 (controlo) | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | 1,0 \pm 0,2 | 1,2 \pm 0,0* | 1,8 \pm 0,0* |
| CYP 2D6 | 0 (controlo) | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | 1,4 \pm 0,3 | 1,8 \pm 0,3 | 1,2 \pm 0,3 |
| CYP 3A4 | 0 (controlo) | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | 2,2 \pm 0,3* | 0,9 \pm 0,4 | 0,9 \pm 0,3 |
| UGT 1A1 | 0 (controlo) | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| | 1 | 3,7 \pm 1,1* | 0,6 \pm 0,2* | 0,1 \pm 0,0* |

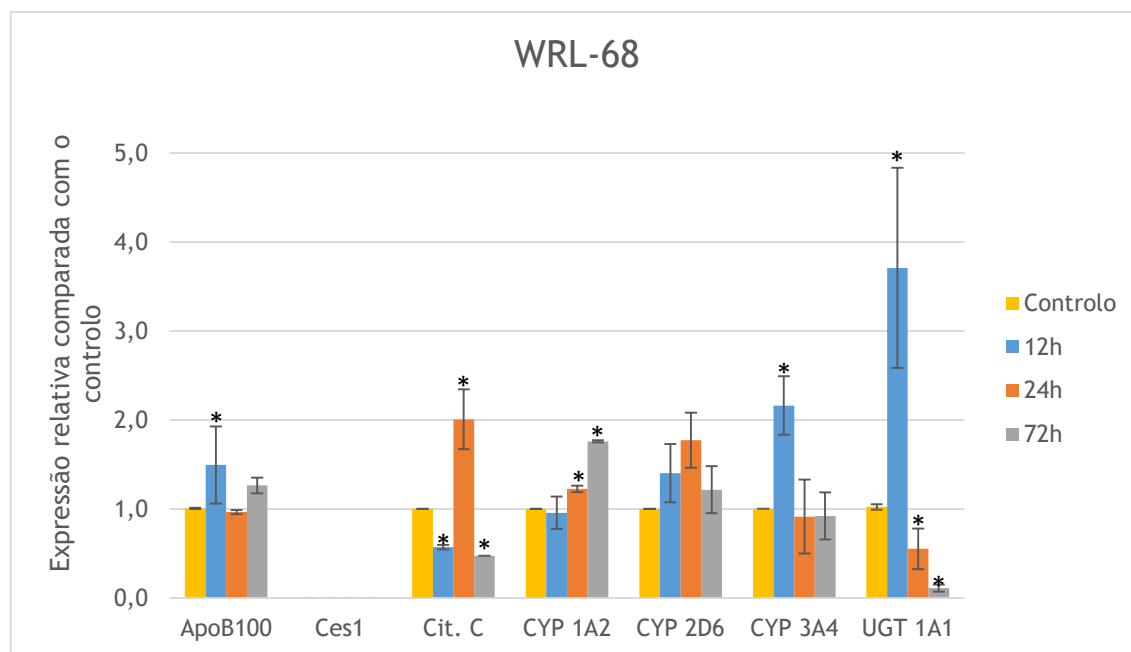


Figura 6. Gráfico da expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas células WRL-68. Os valores apresentados correspondem à média da expressão relativa \pm desvio-padrão após a incubação com 0 e 1 μ M de SA durante 12, 24, 72 h e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).

Conforme mencionado atrás, a análise da expressão hepática de genes foi também realizada na linha celular WRL-68. Conforme constante na tabela 10 e figura 8 a incubação das células WRL-68 com 1 μM de SA promoveu um aumento da expressão relativa de mRNA das Apo B100 e CYP 3A4, logo após 12 h de incubação com o composto ($1,5 \pm 0,4$ e $2,2 \pm 0,3$, respetivamente) tendo os mesmos sido anulados nos períodos de tempo subsequentes.

Por outro lado, nestas células não foi detetada a expressão de Ces 1, indicando que as mesmas não expressam este gene. Além disso, após uma pesquisa realizada na literatura, não foram identificados trabalhos anteriores nos quais tivessem analisado a expressão deste gene nestas células.

No que respeita à expressão relativa de mRNA de Cit. C os resultados obtidos mostraram que, com exceção para as 24 h de incubação na qual a expressão relativa dobrou, a incubação das células com SA promoveu a sua diminuição, comparativamente com o controlo (12 h: $0,6 \pm 0,0$; 72 h: $0,5 \pm 0,0$).

De acordo com os resultados foi ainda observado que também a expressão relativa de mRNA das isoformas do CYP450 foi alterada após exposição das células WRL-68 a 1 μM de SA. De facto, observou-se que o CYP 1A2 aumentou após 24 h ($1,2 \pm 0,0$) e 72 h ($1,8 \pm 0,0$) de incubação com o composto enquanto a isoforma 2D6 revelou não sofrer alterações significativas na sua expressão relativa.

Por último, também o gene UGT 1A1 sofreu alterações ao nível da sua expressão relativa sendo que: aumentou bastante significativamente após 12 h de incubação ($3,7 \pm 1,1$), tendo esse aumento sido anulado e contrariado após 24 h ($0,6 \pm 0,2$) e tornou-se quase nulo após 72 h ($0,1 \pm 0,0$).

4.3. Comparação da expressão de genes nas linhas celulares estudadas

Apesar alguns autores considerarem a SA uma substância com um perfil seguro, pouco se sabe acerca dos seus potenciais efeitos a nível hepático, em particular quando consumida regularmente e por períodos de tempo prolongados.

De acordo com os objetivos definidos no presente estudo os dados obtidos através da análise da expressão relativa de Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas linhas celulares Hep G2 e WRL-68 revelaram, pela primeira vez, alguns dos potenciais efeitos hepáticos resultantes do consumo de *S. divinorum*. Assim, apesar de se tratar de um estudo *in vitro*, e como tal com todas as limitações advindas da utilização deste tipo de modelos biológicos, puderam observar-se diversas alterações ao nível da expressão relativa dos genes em estudo, as quais, a serem corroboradas através de estudos *in vivo*, poderão ter um papel preponderante a nível hepático (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da expressão relativa dos genes Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 e UGT 1A1 nas linhas celulares Hep G2 e WRL-68 após incubação com 1 µM de SA durante 12, 24 e 72 h.

| Gene | Hep G2 | | | WRL-68 | | |
|-----------|------------------------|------|------|--------|------|------|
| | Tempo de incubação (h) | | | | | |
| | 12 | 24 | 72 | 12 | 24 | 72 |
| hApo B100 | x1,3 | x1,0 | x0,8 | x1,5 | x1,0 | x1,3 |
| hCes 1 | x1,1 | x1,2 | x1,1 | - | - | - |
| hCit. C | x2,3 | x0,4 | x1,1 | x0,6 | X2,0 | x0,5 |
| hCYP 1A2 | x2,9 | x0,4 | x0,6 | x1,0 | x1,2 | x1,8 |
| hCYP 2D6 | x3,3 | x0,4 | x1,0 | x1,4 | x1,8 | x1,2 |
| hCYP 3A4 | x1,2 | x0,8 | x0,4 | x2,2 | x0,9 | x0,9 |
| hUGT 1A1 | x1,2 | x1,9 | x0,6 | x3,7 | x0,6 | x0,1 |

O gene Apo B100 codifica para uma proteína essencial no metabolismo dos lípidos na formação de LDL e uma diminuição na sua expressão pode induzir certas doenças como a hipercolesterolemia. Assim pela análise obtida do gene Apo B100 nas linhas celulares em estudo verificou-se que, após o período de incubação menor, nas Hep G2 e WRL-68, a sua expressão relativa aumentou ligeiramente, tendo este efeito sido anulado nos períodos de tempo subsequentes.

Num estudo realizado em ratinhos transgênicos foi mostrado que a sobreexpressão de Apo B100 resultou num aumento do colesterol LDL e numa diminuição do colesterol HDL no sangue (McCormick *et al.*, 1996). Num outro estudo realizado em vacas, os seus autores concluíram que níveis diminuídos da expressão de Apo B100 são responsáveis pela acumulação de lípidos no fígado (Basiricò *et al.*, 2009).

Pal *et al.* (2003) mostrou também que as substâncias polifenólicas presentes no vinho tinto na linha celular Hep G2 promoveram o aumento da expressão do recetor LDL e a inibição da secreção de Apo B100 diminuindo os níveis intracelulares de colesterol (Pal *et al.*, 2003).

Com base nestes estudos, e de acordo com os resultados obtidos, pode inferir-se que os efeitos da exposição prolongada a SA ao nível da expressão de Apo B100 poderão não ser benéficos, porém seriam necessário outros estudos para entender melhor o efeito que a SA possui no metabolismo dos lípidos.

O gene Ces 1 codifica uma enzima importante envolvida no metabolismo de xenobióticos e outras substâncias endógenas tóxicas para o organismo. A sua sobreexpressão pode estar correlacionada com maior metabolização de xenobióticos com conseqüente diminuição dos seus efeitos prejudiciais para o organismo (Fleming *et al.*, 2005).

De acordo com os resultados, apenas na linha celular Hep G2 foi observado um ligeiro aumento na sua expressão relativa após 24 h de incubação com 1 μ M de SA, uma vez que nas WRL-68, a expressão deste gene nem tão pouco foi detetada.

No presente estudo, os resultados indiciam que, à partida, este gene não deverá ser um alvo primordial da SA.

A proteína Cit. C está envolvida, entre outros, nos mecanismos apoptóticos das células e na respiração celular, a qual constitui um processo crucial para a sobrevivência celular e no qual o Cit. C é um dos componentes seus indispensáveis (Hüttemann *et al.*, 2011). No caso das WRL-68 observou-se que a sua incubação com 1 μ M de SA promoveu uma diminuição da sua expressão para 12 h de incubação, tendo esta sido contrariada após 24 h para aproximadamente o dobro, comparativamente com o controlo. No entanto, para períodos de incubação mais longos (72 h) a expressão do Cit. C voltou a ficar drasticamente comprometida (0,5 x). Por sua vez, nas células Hep G2 para períodos de incubação mais curtos foi observado um aumento na expressão deste gene, a qual foi também nestas células contrariado para períodos de incubação mais longos.

Considerando o papel desta molécula no organismo no geral, e na sobrevivência celular em particular, poderá inferir-se que as alterações na expressão do Cit. C resultantes do consumo de SA poderão ter um impacto bastante significativo no organismo.

As isoformas do CYP450 incluídas neste estudo estão todas envolvidas no metabolismo de vários compostos. Por isso, a sua biodisponibilidade é importante para que potenciais compostos adversos possam ser metabolizados e eliminadas do organismo (Smith *et al.*, 1998). De facto, é notável que o metabolismo de diversos compostos esteja reduzido em várias patologias hepáticas, maioritariamente devido às enzimas do CYP450 terem a sua expressão alterada (George *et al.*, 1995).

Dos resultados obtidos observou-se que, nas células WRL-68, a expressão relativa da isoforma 1A2 aumentou a partir das 24 h de incubação com SA enquanto nas Hep G2 existe um aumento após as 12 h de incubação, tendo-se seguido uma diminuição nos períodos de tempo mais longos. Considerando que esta isoforma está envolvida no metabolismo da SA é de esperar que estas alterações na sua expressão tenham também elas efeitos ao nível do seu metabolismo hepático. Em relação à isoforma 2D6 não foi observada qualquer alteração em termos da sua expressão relativa nas células WRL-68 após exposição a SA, enquanto, nas células Hep G2 se observou um aumento após 12 h de incubação, tendo-se seguido uma diminuição para cerca de metade às 24 h, a qual foi anulada às 72 h.

Considerando o papel da CYP 2D6 no metabolismo de fármacos e xenobióticos (Correia & Hollenberg, 2015), incluindo antiarrítmicos, antidepressivos e analgésicos (Bibi, 2008) pode concluir-se acerca da sua relevância em termos da sua regulação pela SA.

Por último, a expressão de mRNA CYP 3A4 nas células Hep G2 diminuiu após 24 h de incubação com 1 μ M de SA. Já nas WRL-68 observou-se um aumento período de incubação mais curto mantendo-se inalterada nos seguintes.

Em geral, alterações relacionadas com a expressão das isoformas do CYP450 estão relacionadas diretamente com a taxa de metabolização das substâncias que essas enzimas têm como substratos preferenciais. Por isso, o consumo de SA poderá ser benéfico em certos casos e prejudicial noutros.

De facto, dado que se trata de uma isoforma que é acentuadamente induzida tanto *in vivo* como *in vitro* em resposta a uma exposição de uma variedade de compostos (Lehmann *et al.*, 1998), apresenta um grande espectro de substratos e é responsável pela biotransformação de mais de 60 % dos fármacos comercialmente disponíveis, é de esperar que as alterações na sua expressão aqui reportadas, a serem confirmadas *in vivo*, tenham impacto para o organismo.

A UGT 1A1 está envolvida nas reações de fase II de destoxificação do organismo a substâncias que possam danificar o organismo. Nas células WRL-68 e Hep G2 observou-se um aumento na sua expressão após 24 h e 12 h respetivamente, contrariados com uma diminuição posterior da expressão deste gene que, no caso das WRL-68 quase foi nulo após 72 h de incubação. Dado que a UGT 1A1 é a única enzima que metaboliza a bilirrubina, uma diminuição da sua expressão

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

poderá conduzir a icterícia (hiperbilirrubinemia), a qual, quando não controlada, pode alcançar o cérebro e provocar danos neurológicos graves (Sumida *et al.*, 2013).

De um modo geral, os resultados obtidos, indiciam que o consumo prolongado de SA poderá conduzir a uma diminuição da expressão de UGT 1A1 a qual poderá ter um impacto bastante significativo no organismo.

5. Conclusões e Perspetivas futuras

A criação e o aparecimento de NPS tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Isto tornou-se cada vez mais uma preocupação para a saúde pública pois a falta do conhecimento dos potenciais efeitos de algumas NPS é vasto o que configura um risco para a sociedade, e os seus consumidores. O interesse pela *S. divinorum*, nomeadamente pelo seu composto bioativo o qual lhe confere propriedades psicoativas, a SA, tem sido cada vez maior na comunidade científica pelas suas características naturais e únicas e na comunidade juvenil pelos efeitos associados ao seu consumo. Enquanto alguns autores defendem que a SA é um composto seja seguro para o organismo devido a sua baixa toxicidade outros não concordam e alegam que o mesmo provoca alucinações bastante intensas que podem colocar a vida dos seus consumidores em risco.

A SA é uma substância que tem como alvo preferencial o SNC, no entanto, os efeitos que esta substância pode causar a nível hepático são ainda desconhecidos.

A realização deste trabalho permitiu mostrar pela primeira vez alguns dos efeitos que o consumo regular de SA poderá ter a nível hepático. No geral, verificou-se que a SA é citotóxica de forma dependente da concentração, do tempo de exposição e da linha celular, e que apenas a concentração de 50 μM de SA provocam diminuições bastante significativas na viabilidade celular relativa nas linhas celulares estudadas. Importa ainda salientar que 10 μM de SA equivalem a 432 μg de SA e 216 μg de *S. divinorum*, indicando que esta concentração se encontra no limiar da concentrações usualmente consumidas, aparentando deste modo ser segura em termos de citotoxicidade no organismo quando consumida. Contudo, tratando-se este apenas de um estudo *in vitro*, todas estas conclusões deverão ser consideradas com bastante precaução.

Em relação aos efeitos que a SA possui ao nível da expressão dos genes em estudo observou-se que, de um modo geral, a SA pode exercer efeitos positivos ou negativos, consoante o gene em análise, o tempo de incubação com o composto e o tipo celular. Assim, e por se tratar do primeiro estudo que avaliou o potencial papel da SA na expressão hepática de certos genes, são necessárias investigações futuras para confirmar que os efeitos apresentados neste estudo são observados também *in vivo* e diretamente resultantes ao consumo de SA.

A partir deste trabalho, uma nova linha de investigação surgiu e futuros trabalhos deverão ser realizados de modo a avaliar *in vitro* a alteração da expressão proteica destes genes e a confirmar as alterações identificadas *in vivo*, em modelos animais (ratos).

6. Referências

- Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. *Surgical Clinics of North America*, 90(4), 643-653.
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., & Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282(5739), 615-616.
- Akaberi, M., Mehri, S., & Iranshahi, M. (2015). Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species. *Fitoterapia*, 100, 118-132.
- Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 9(187), 1-17.
- Baggott, M., Erowid, E., & Erowid, F. (2004). A survey of *Salvia divinorum* users. *Erowid Extracts*, 6, 12-14.
- Basiricò, L., Bernabucci, U., Morera, P., Lacetera, N., & Nardone, A. (2009). Gene expression and protein secretion of apolipoprotein B100 (ApoB100) in transition dairy cows under hot or thermoneutral environments, 8(2), 592-594.
- Bibi, Z. (2008). Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition & Metabolism*, 5(27), 1-10.
- Bigham, A. K., Munro, T. A., Rizzacasa, M. A., & Robins-Browne, R. M. (2003). Divinatorins A-C, new neoclerodane diterpenoids from the controlled sage *Salvia divinorum*. *Journal of Natural Products*, 66(9), 1242-1244.
- Borén, J., Lee, I., Zhu, W., Arnold, K., Taylor, S., & Innerarity, T. L. (1998). Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective Apo-B100. *Journal of Clinical Investigation*, 101(5), 1084-1093.
- Braida, D., Capurro, V., Zani, A., Rubino, T., Viganò, D., Parolaro, D., & Sala, M. (2009). Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of salvinatorin A, the main active ingredient of *Salvia divinorum*, in rodents. *British Journal of Pharmacology*, 157(5), 844-853.
- Braida, D., Limonta, V., Capurro, V., Fadda, P., Rubino, T., Mascia, P., ... Sala, M. (2008). Involvement of kappa-opioid and endocannabinoid system on Salvinatorin A-induced reward. *Biological Psychiatry*, 63(3), 286-292.
- Butelman, E. R., Caspers, M., Lovell, K. M., Kreek, M. J., & Prisinzano, T. E. (2012). Behavioral effects and central nervous system levels of the broadly available κ -agonist hallucinogen salvinatorin A are affected by P-glycoprotein modulation *in vivo*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(3), 802-808.
- Cai, J., Yang, J., & Jones, D. P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of

- cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366(1-2), 139-149.
- Calado, V. (2013). *Novas Substâncias Psicoativas. O caso da Salvia Divinorum*.
- Capasso, R., Borrelli, F., Capasso, F., Siebert, D. J., Stewart, D. J., Zjawiony, J. K., & Izzo, A. A. (2006). The hallucinogenic herb *Salvia divinorum* and its active ingredient salvinorin A inhibit enteric cholinergic transmission in the guinea-pig ileum. *Neurogastroenterology and Motility*, 18(1), 69-75.
- Casselmann, I., Nock, C. J., Wohlmuth, H., Weatherby, R. P., & Heinrich, M. (2014). From local to global-fifty years of research on *Salvia divinorum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 768-783.
- Cemazar, M., Hreljac, I., Sersa, G., & Filipic, M. (2009). Construction of EGFP expressing HepG2 cell line using electroporation. *IFMBE Proceedings*, 25(13), 128-131.
- Chavkin, C. (2011). The therapeutic potential of κ -opioids for treatment of pain and addiction. *Neuropsychopharmacology*, 36(1), 369-370.
- Chavkin, C., Sud, S., Jin, W., Stewart, J., Zjawiony, J. K., Siebert, D. J., ... Roth, B. L. (2004). Salvinorin A, an Active Component of the Hallucinogenic Sage. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(3), 1197-1203.
- Cunningham, C. W., Rothman, R. B., & Prisinzano, T. E. (2011). Neuropharmacology of the naturally occurring kappa-opioid hallucinogen salvinorin A. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 316-347.
- Decreto-Lei nº. 54/2013 de 17 de abril do Ministério da Saúde, Pub. L. No. Diário da República: 1.ª série, Nº. 75 (2013).
- Diaz, J.-L. (2013). *Salvia divinorum*: a psychopharmacological riddle and a mind-body prospect. *Current Drug Abuse Reviews*, 6(1), 43-53.
- Ebner, S. R., Roitman, M. F., Potter, D. N., Rachlin, A. B., & Chartoff, E. H. (2010). Depressive-like effects of the kappa opioid receptor agonist salvinorin A are associated with decreased phasic dopamine release in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology*, 210(2), 241-252.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., & Bacher, A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6(2), 78-84.
- ESPAD. (2015). *Results from the European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs*.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2009). *Early-warning system on new psychoactive substances - Operating guidelines*.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2011). *Drugs in focus*.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2015a). *New psychoactive substances in Europe*.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2015b). *Salvia divinorum drug profile*. Retirado a 4 de maio, 2016, de

<http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/salvia#chemistry>

- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2016). *European Union drug markets report - Strategic Overview*.
- Falla, K. (1999). Opioid Medication Potential Risks and Complications. Retirado a 16 de agosto, 2016, de <http://www.spine-health.com>
- Fichna, J., Dickey, M., Lewellyn, K., Janecka, A., Zjawiony, J. K., Macnaughton, W. K., & Storr, M. A. (2012). Salvinorin A Has Antiinflammatory and Antinociceptive Effects in Experimental Models of Colitis in Mice Mediated by KOR and CB1 Receptors. *Inflamm Bowel Dis*, 18(6), 1137-1145.
- Fichna, J., Schicho, R., Janeck, A., Zjawiony, J. K., & Storr, M. (2009). Selective natural kappa opioid and cannabinoid receptor agonists with a potential role in the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Drug News & Perspectives*, 22(7), 383-392.
- Fisher, E. A., Zhou, M., Mitchell, D. M., Wu, X., Omura, S., Wang, H., ... Ginsberg, H. N. (1997). The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20427-20434.
- Fisher, M. B., Vandenbranden, M., Findlay, K., & Burchell, B. (2000). Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics*, 10, 727-739.
- Fleming, C. D., Bencharit, S., Edwards, C. C., Hyatt, J. L., Tsurkan, L., Bai, F., ... Redinbo, M. R. (2005). Structural insights into drug processing by human carboxylesterase 1: Tamoxifen, mevastatin, and inhibition by benzil. *Journal of Molecular Biology*, 352(1), 165-177.
- Freeman, K. B., Naylor, J. E., Prisinzano, T. E., & Woolverton, W. L. (2014). Assessment of the kappa opioid agonist, salvinorin A, as a punisher of drug self-administration in monkeys. *Psychopharmacology*, 231(14), 2751-2758.
- George, J., Murray, M., Byth, K., & Farrell, G. C. (1995). Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology*, 21(1), 120-128.
- Grilli, M., Neri, E., Zappettini, S., Massa, F., Bisio, A., Romussi, G., ... Pittaluga, A. (2009). Salvinorin A exerts opposite presynaptic controls on neurotransmitter exocytosis from mouse brain nerve terminals. *Neuropharmacology*, 57(5-6), 523-530.
- Gruber, J. W., Siebert, D. J., Marderosian, A. H. Der, & Hock, R. S. (1999). High performance liquid chromatographic quantification of salvinorin A from tissues of *Salvia divinorum* Epling and *Jativa-M*. *Phytochemical Analysis*, 10(1), 22-25.
- Guengerich, F. P. (1999). Cytochrome P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 1-17.

- Guengerich, F. P. (2015). Human Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (pp. 523-785).
- Gutiérrez-Ruiz, M. C., Bucio, L., Souza, V., Gómez, J. J., Campos, C., & Cárabez, A. (1994). Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 cells in culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal: Journal of the Society for In Vitro Biology*, 30(6), 366-371.
- Hanes, K. R. (2001). Antidepressant Effects of the Herb *Salvia Divinorum*: A Case Report. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 21(6), 634-635.
- Hanson, J. R. (2010). Natural products from the hallucinogenic sage. *Science Progress*, 93(2), 171-180.
- Harding, W. W., Tidgewell, K., Byrd, N., Cobb, H., Dersch, C. M., Butelman, E. R., ... Prisinzano, T. E. (2005). Neoclerodane diterpenes as a novel scaffold for μ opioid receptor ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(15), 4765-4771.
- Harding, W. W., Tidgewell, K., Schmidt, M., Shah, K., Dersch, C. M., Snyder, J., ... Prisinzano, T. E. (2005). Salvinicins A and B, new neoclerodane diterpenes from *Salvia divinorum*. *Organic Letters*, 7(14), 3017-3020.
- Hooker, J. M., Xu, Y., Schiffer, W., Shea, C., Carter, P., & Fowler, J. S. (2008). Pharmacokinetics of the potent hallucinogen, salvinorin A in primates parallels the rapid onset, short duration of effects in humans. *Neuroimage*, 41(3), 1044-1050.
- Humerickhouse, R., Lohrbach, K., Li, L., Bosron, W. F., & Dolan, M. E. (2000). Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Research*, 60(5), 1189-1192.
- Hüttemann, M., Pecina, P., Rainbolt, M., Sanderson, T. H., Kagan, V. E., Samavati, L., ... Lee, I. (2011). The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: from respiration to apoptosis. *Mitochondrion*, 11(3), 369-381.
- Imanshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2006). The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytotherapy Research*, 20(6), 427-437.
- Iyer, L., Hall, D., Das, S., Mortell, M. A., Ramírez, J., Kim, S., ... Ratain, M. J. (1999). Phenotype-genotype correlation of *in vitro* SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 65(5), 576-582.
- John, T. F., French, L. G., & Erlichman, J. S. (2006). The antinociceptive effect of Salvinorin A in mice. *European Journal of Pharmacology*, 545(2-3), 129-133.
- Johnson, M. W., & Griffiths, R. R. (1996). *Scientific Considerations Concerning Salvia Divinorum and Salvinorin A: Implications for Proposed Legislation*.
- Johnson, M. W., MacLean, K. A., Reissig, C. J., Prisinzano, T. E., & Griffiths, R. R. (2011). Human psychopharmacology and dose-effects of salvinorin A, a kappa opioid agonist

- hallucinogen present in the plant *Salvia divinorum*. *Drug and Alcohol Dependence*, 115(1-2), 150-155.
- Kivell, B. M., Ewald, A. W. M., & Prisinzano, T. E. (2014). Salvinorin A analogs and other κ -opioid receptor compounds as treatments for cocaine abuse. *Advances in Pharmacology*, 69, 482-511.
- Kowalczyk, A. P., Raman, V., Galal, A. M., Khan, I. A., Siebert, D. J., & Zjawiony, J. K. (2014). Vegetative anatomy and micromorphology of *Salvia divinorum* (Lamiaceae) from Mexico, combined with chromatographic analysis of salvinorin A. *Journal of Natural Medicines*, 68(1), 63-73.
- Kuntz, E., & Kuntz, H. (2008). Biochemistry and Functions of the Liver. In *Hepatology Textbook and Atlas* (pp. 35-76).
- Kutrzeba, L., Dayan, F. E., Howell, J., Feng, J., Giner, J.-L., & Zjawiony, J. K. (2007). Biosynthesis of salvinorin A proceeds via the deoxyxylulose phosphate pathway. *Phytochemistry*, 68(14), 1872-81.
- Kutrzeba, L., Ferreira, D., & Zjawiony, J. K. (2009). Salvinorins J from *Salvia Divinorum*: Mutarotation in the Neoclerodane System. *Journal of Natural Products*, 72(7), 1361-1363.
- Lahti, R. A., Mickelson, M. M., Mccaal, J. M., & Von Voigtlander, P. F. (1985). [3H]U-69593 A highly selective ligand for the opioid κ receptor. *European Journal of Pharmacology*, 109(2), 281-284.
- Lalanne, L., Ayranci, G., Kieffer, B. L., & Lutz, P.-E. (2014). The kappa opioid receptor: from addiction to depression, and back. *Frontiers in Psychiatry*, 5(170), 1-17.
- Lange, J. E., Reed, M. B., Croff, J. M. K., & Clapp, J. D. (2008). College student use of *Salvia divinorum*. *Drug and Alcohol Dependence*, 94(1-3), 263-266.
- Lee, D. Y. W., Ma, Z., Liu-Chen, L. Y., Wang, Y., Chen, Y., Carlezon, W. A., & Cohen, B. (2005). New neoclerodane diterpenoids isolated from the leaves of *Salvia divinorum* and their binding affinities for human kappa opioid receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(19), 5635-5639.
- Lehmann, J. M., McKee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T., & Kliewer, S. A. (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *Journal of Clinical Investigation*, 102(5), 1016-1023.
- Listos, J., Merska, A., & Fidecka, S. (2011). Pharmacological activity of Salvinorin A, the major component of *Salvia divinorum*. *Pharmacological Reports*, 63(6), 1305-1309.
- Margalho, C., Gallardo, E., Castanheira, A., Vieira, D. N., López-Rivadulla, M., & Real, F. C. (2013). A validated procedure for detection and quantitation of salvinorin a in pericardial fluid, vitreous humor, whole blood and plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1304, 203-210.
- Marques, S. C., & Ikediobi, O. N. (2010). The clinical application of UGT1A1 pharmacogenetic

- testing: gene-environment interactions. *Human Genomics*, 4(4), 238-249.
- Martinho, A., Silva, S. M., & Gallardo, E. (2015). Cytotoxic effects of salvinorin A, a major constituent of *Salvia Divinorum*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 12(5), 432-440.
- Mccormick, S. P. A., Ng, J. K., Véniant, M., Borén, J., Pierotti, V., Flynn, L. M., ... Young, S. G. (1996). Transgenic Mice that Over express Mouse Apolipoprotein B. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(20), 11963-11970.
- McCurdy, C. R., Sufka, K. J., Smith, G. H., Warnick, J. E., & Nieto, M. J. (2006). Antinociceptive profile of salvinorin A, a structurally unique kappa opioid receptor agonist. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83(1), 109-113.
- McDonough, P. C., Holler, J. M., Vorce, S. P., Bosy, T. Z., Magluilo, J., & Past, M. R. (2008). The detection and quantitative analysis of the psychoactive component of *Salvia divinorum*, salvinorin A, in human biological fluids using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 32(6), 417-421.
- Mirzaei, M., Mirzaei, H., Sahebkar, A., Bagherian, A., Khoi, M. J. M., Mirzaei, H. R., ... Oskuee, R. K. (2015). Phylogenetic Analysis of Selected Menthol-Producing Species Belonging to the Lamiaceae Family. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 34(9), 650-657.
- Moreno, I., da Fonseca, B., Oppolzer, D., Martinho, A., Barroso, M., Cruz, A., ... Gallardo, E. (2013). Analysis of Salvinorin A in urine using microextraction in packed syringe and GC-MS/MS. *Bioanalysis*, 5(6), 661-668.
- Mowry, M., Mosher, M., & Briner, W. (2003). Acute physiologic and chronic histologic changes in rats and mice exposed to the unique hallucinogen salvinorin A. *Journal of Psychoactive Drugs*, 35(3), 379-82.
- Nemeth, C. L., Paine, T. A., Rittiner, J. E., Béguin, C., Carrol, F. I., Roth, B. L., ... Carlezon Jr, W. A. (2015). Role of kappa-opioid receptors in the effects of salvinorin A and ketamine on attention in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 210(2), 263-274.
- Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência. (2015). *Relatório Europeu sobre Drogas - Tendências e evoluções*.
- Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência. (2016). *Relatório Europeu sobre Drogas - Tendências e evoluções*.
- Openstax College. (2013). Accessory Organs in Digestion: The Liver, Pancreas and Gallbladder. In *Anatomy and Physiology, Chapter 23: The Digestive System* (pp. 1056-1060).
- Ortega, A., Blount, J. F., & Manchand, P. S. (1982). Salvinorin, a New trans-Neoclerodane Diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2505-2508.
- Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1259-1263.
- Pal, S., Ho, N., Santos, C., Dubois, P., Mamo, J., Croft, K., & Allister, E. (2003). Red wine

- polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *The Journal of Nutrition*, 133(October 2002), 700-706.
- Palombo, E. A. (2011). Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-15.
- Pentea, M., Butu, M., Samfira, I., Cristina, R. T., & Butnariu, M. (2015). Extraction and Analytical Study of Salvinorin a From Leaves of *Salvia Divinorum*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 10(1), 291-297.
- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants ' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1-6.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 2003-2007.
- Pichini, S., Abanades, S., Farré, M., Pellegrini, M., Marchei, E., Pacifici, R., ... Zuccaro, P. (2005). Quantification of the plant-derived hallucinogen Salvinorin A in conventional and non-conventional biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry after *Salvia divinorum* smoking. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(12), 1649-1656.
- Portaria nº. 154/2013 de 17 de abril do Ministério da Saúde, Pub. L. No. Diário da República: 1.ª série, Nº. 75 (2013).
- PubChem. (2005). Salvinorin A. Retirado a 9 de julho, 2016, de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salvinorin_A
- Redinbo, M. R., Bencharit, S., & Potter, P. M. (2003). Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery. *Biochemical Society Transactions*, 31(3), 620-624.
- Rossi, A., Pace, S., Tedesco, F., Pagano, E., Guerra, G., Troisi, F., ... Capasso, R. (2016). The hallucinogenic diterpene salvinorin A inhibits leukotriene synthesis in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, 106, 64-71.
- Roth, B. L., Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D., Rice, K. C., Steinberg, S., ... Rothman, R. B. (2002). Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous kappa opioid selective agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11934-9.
- Rowland, A., Knights, K. M., Mackenzie, P. I., & Miners, J. O. (2008). The "albumin effect" and drug glucuronidation: Bovine serum albumin and fatty acid-free human serum albumin enhance the glucuronidation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 substrates but not UGT1A1 and UGT1A6 activities. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(6), 1056-1062.
- Schmidt, M. S., Prisinzano, T. E., Tidgewell, K., Harding, W., Butelman, E. R., Kreek, M. J., & Murry, D. J. (2005). Determination of Salvinorin A in body fluids by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Chromatography B*, 818(2), 221-225.
- Schmidt, M., Schmidt, M. S., Butelman, E. R., Harding, W. W., Tidgewell, K., Murry, D. J., ...

- Prisinzano, T. E. (2005). Pharmacokinetics of the plant-derived kappa-opioid hallucinogen salvinorin A in nonhuman primates. *Synapse*, 58(3), 208-210.
- Shirota, O., Nagamatsu, K., & Sekita, S. (2006). Neo-clerodane diterpenes from the hallucinogenic sage *Salvia divinorum*. *Journal of Natural Products*, 69(12), 1782-1786.
- Siebert, D. J. (1994). *Salvia divinorum* and salvinorin A: New pharmacologic findings. *Journal of Ethnopharmacology*, 43(1), 53-56.
- Siebert, D. J. (2004). Localization of salvinorin A and related compounds in glandular trichomes of the psychoactive sage, *Salvia divinorum*. *Annals of Botany*, 93(6), 763-771.
- Smith, G., Stubbins, M. J., Harries, L. W., & Wolf, C. R. (1998). Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Biomedical Research*, 28(12), 1129-1165.
- Soediono, B. (1989). The Cell Cycle and Programmed Cell Death. In *Molecular Biology Of The Cell* (4th ed., Vol. 53, pp. 2564-2565).
- Su, D., Riley, J., Armstead, W., & Liu, R. (2012). Salvinorin A Pretreatment Preserves Cerebrovascular Autoregulation After Brain Hypoxic/Ischemic Injury via Extracellular Signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase in Piglets. *Anesthesia & Analgesia*, 114(1), 200-204.
- Sumida, K., Kawana, M., Kouno, E., Itoh, T., Takano, S., Narawa, T., ... Fujiwara, R. (2013). Importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 expression in skin and its induction by UVB in neonatal hyperbilirubinemia. *Molecular Pharmacology*, 84(5), 679-686.
- Teksin, Z. S., Lee, I. J., Nemieboka, N. N., Othman, A. A., Upreti, V. V., Hassan, H. E., ... Eddington, N. D. (2009). Evaluation of the transport, in vitro metabolism and pharmacokinetics of Salvinorin A, a potent hallucinogen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 471-477.
- Valdés, L. J. (1994). *Salvia divinorum* and the unique diterpene hallucinogen, Salvinorin (divinorin) A. *Journal of Psychoactive Drugs*, 26(3), 277-283.
- Valdés, L. J., Chang, H.-M., Visger, D. C., & Koreeda, M. (2001). Salvinorin C, a new neoclerodane diterpene from a bioactive fraction of the hallucinogenic Mexican mint *Salvia divinorum*. *Organic Letters*, 3(24), 3935-3937.
- Valdes III, L. J., Butler, W. M., Hatfield, G. M., Paul, A. G., & Koreeda, M. (1984). Divinorin A, a psychotropic terpenoid, and divinorin B from the hallucinogenic Mexican mint, *Salvia divinorum*. *Journal of Organic Chemistry*, 49(24), 4716-4720.
- Valdés III, L. J., Díaz, J. L., & Paul, A. G. (1983). Ethnopharmacology of Ska María Pastora (*Salvia Divinorum*, Epling and Játiva-M.). *Journal of Ethnopharmacology*, 7(3), 287-312.
- Vortherms, T. A., & Roth, B. L. (2006). Salvinorin A: from natural product to human therapeutics. *Molecular Interventions*, 6(5), 257-265.
- Welty, F. K., Lichtenstein, A. H., Barrett, P. H. R., Dolnikowski, G. G., & Schaefer, E. J. (1999). Human Apolipoprotein (Apo) B-48 and ApoB-100 Kinetics With Stable Isotopes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(12), 2966-2975.

- Xin, J., Zhang, Y., He, Z., & Wang, Z. (2016). Highly selective non-opioid kappa opioid receptor (KOR) agonist salvinorin A protects against forebrain ischemia-induced brain injury in rats. *Brain Research*, 1637, 168-176.
- Young, S. G. (1990). Recent Progress in Understanding Apolipoprotein B. *Circulation*, 82(5), 1574-1595.
- Zhang, Y., Butelman, E. R., Schlussman, S. D., Ho, A., & Kreek, M. J. (2005). Effects of the plant-derived hallucinogen salvinorin A on basal dopamine levels in the caudate putamen and in a conditioned place aversion assay in mice: agonist actions at kappa opioid receptors. *Psychopharmacology*, 179(3), 551-558.

Anexos

Anexo I - Otimização de condições para o PCR em tempo real

a) Eficiências para a linha celular Hep G2

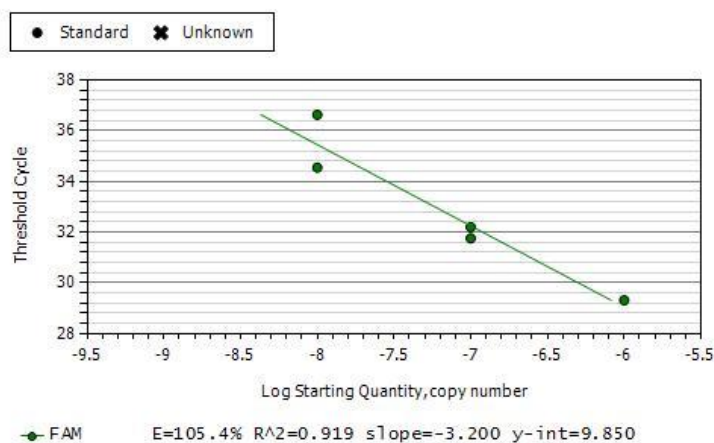


Figura 1. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene Apo B100 nas células Hep G2.

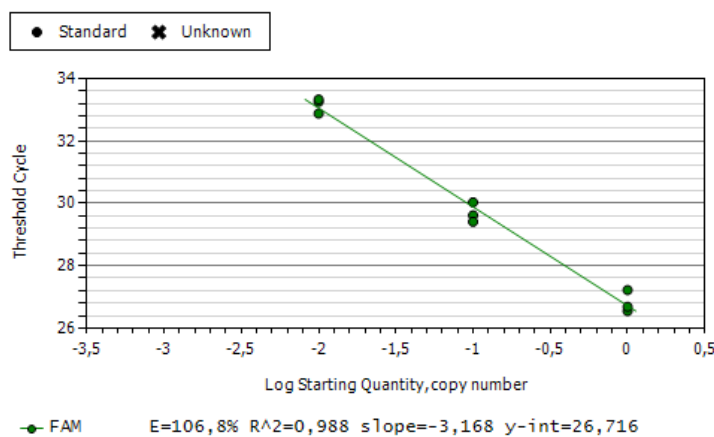


Figura 2. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene Ces 1 nas células Hep G2.

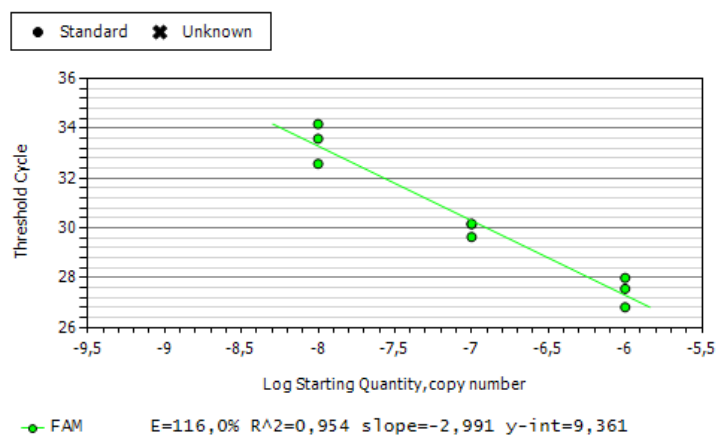


Figura 3. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene Cit. C nas células Hep G2.

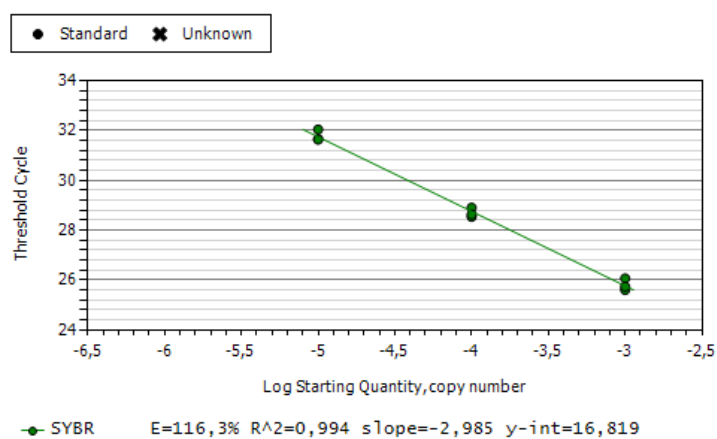


Figura 4. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene CYP 1A2 nas células Hep G2.

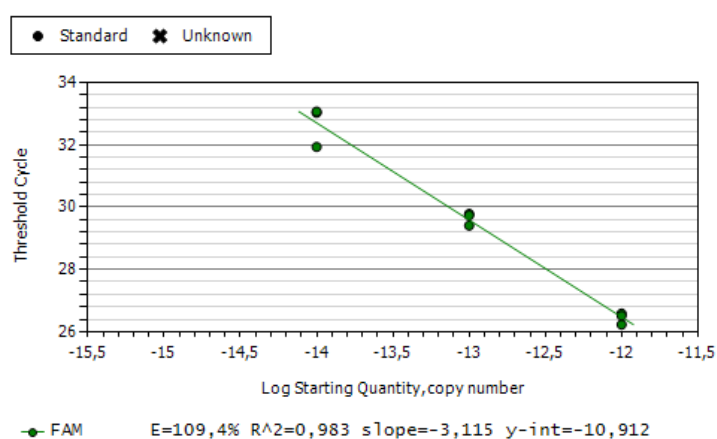


Figura 5. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene CYP 2D6 nas células Hep G2.

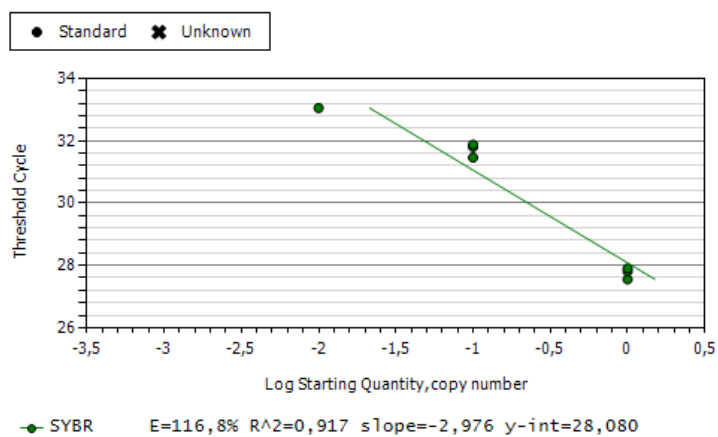


Figura 6. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene CYP 3A4 nas células Hep G2.

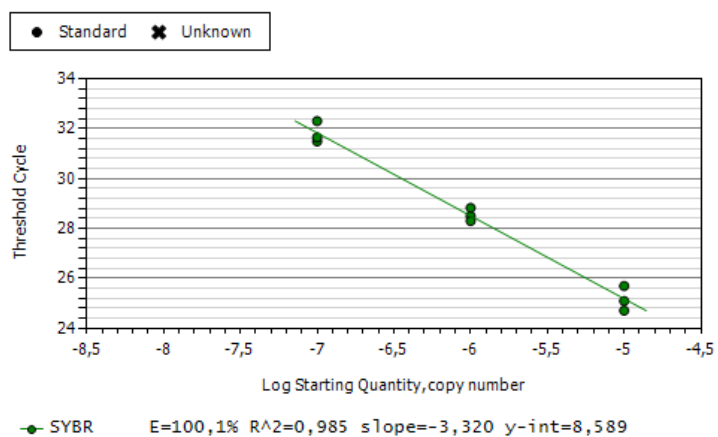


Figura 7. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene GAPDH (controle) nas células Hep G2.

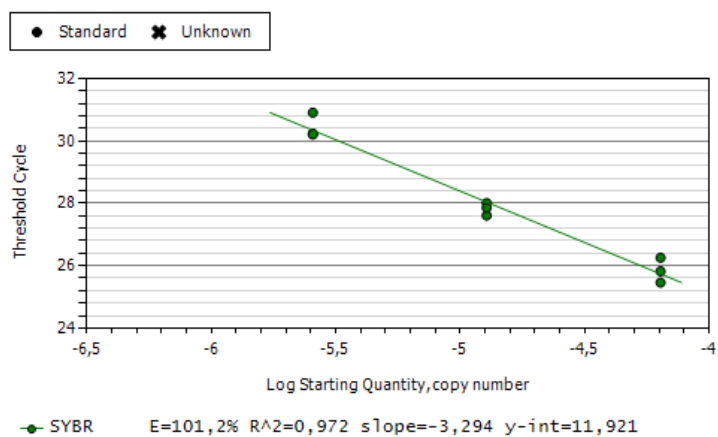


Figura 8. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene UGT 1A1 nas células Hep G2.

b) Eficiências para a linha celular WRL-68

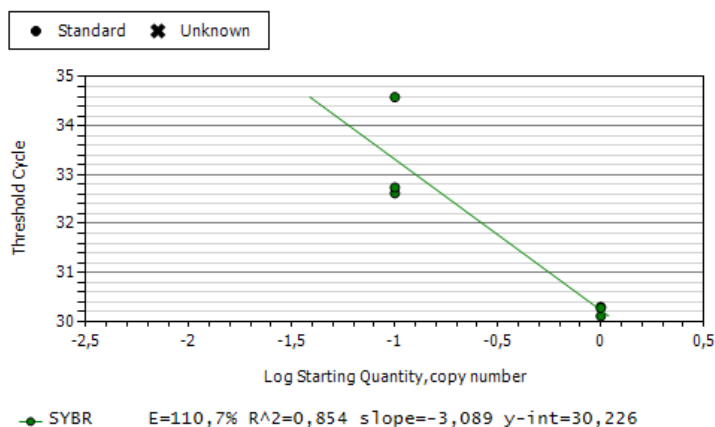


Figura 9. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene Apo B100 nas células WRL-68.

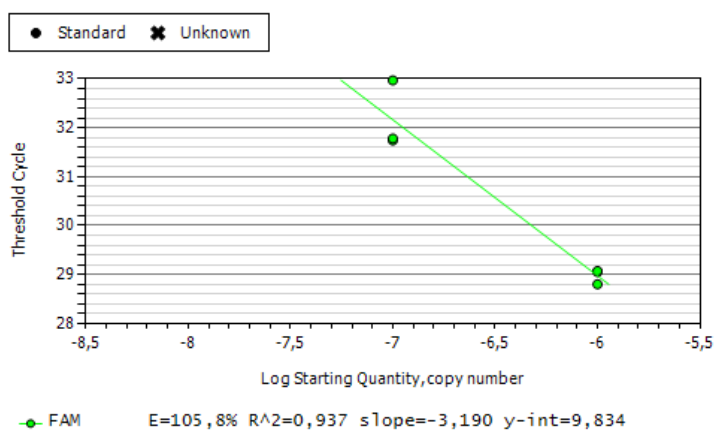


Figura 10. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene Cit. C nas células WRL-68.

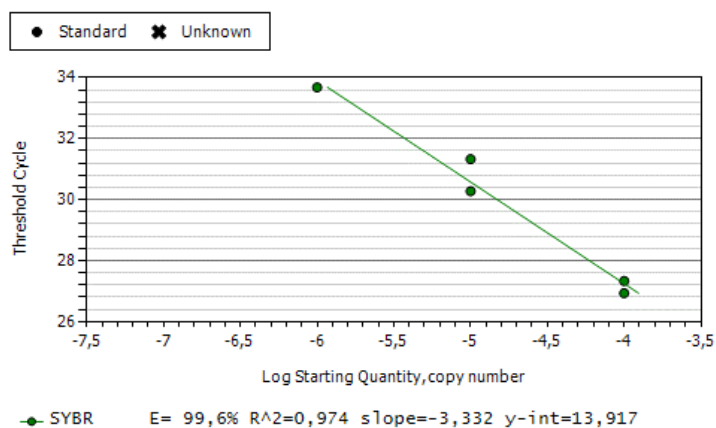


Figura 11. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene CYP 1A2 nas células WRL-68.

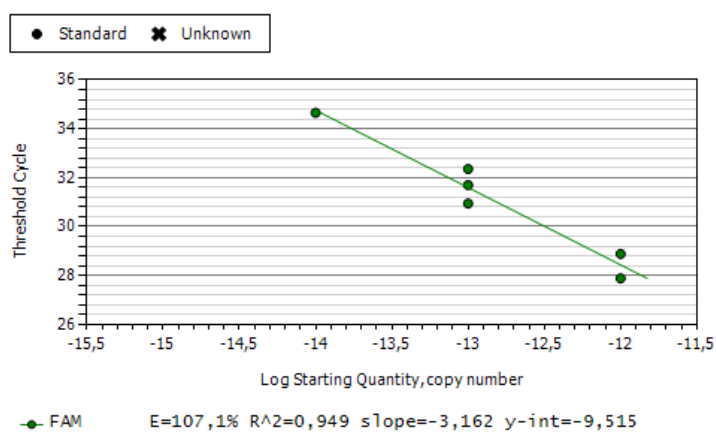


Figura 12. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene CYP 2D6 nas células WRL-68.

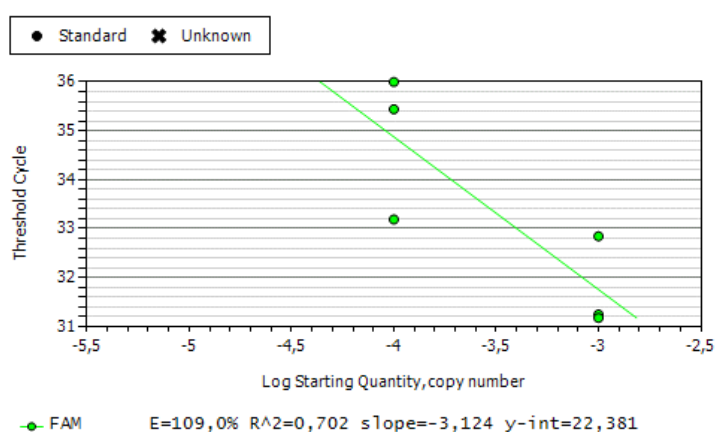


Figura 13. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene CYP 3A4 nas células WRL-68.

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes



Figura 14. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene GAPDH nas células WRL-68.

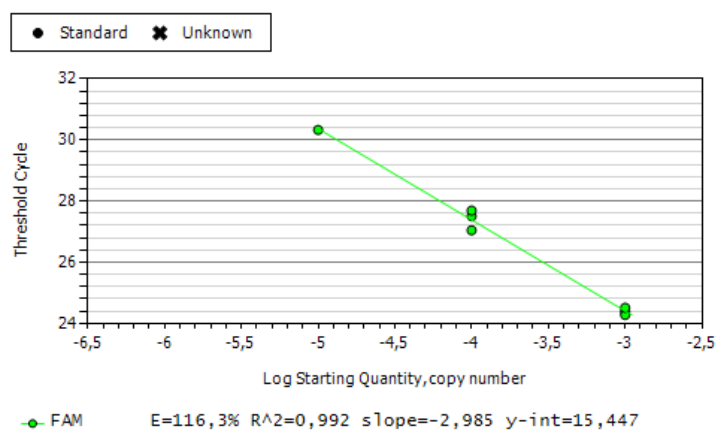


Figura 15. Eficiência do par de *primers* utilizado no PCR em tempo real para o gene UGT 1A1 nas células WRL-68.

Anexo II - Artigo de revisão submetido para a *Phytochemistry*: A unique natural selective *Kappa*-opioid receptor agonist, Salvinorin A, and its roles in human therapeutics

Phytochemistry
Elsevier Editorial System(tm) for
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: A unique natural selective Kappa-opioid receptor agonist, Salvinorin A, and its roles in human therapeutics

Article Type: Review

Section/Category: Molecules of Interest

Keywords: Salvia divinorum, Salvinorin A, Kappa-opioid receptor, hallucinogen, therapeutics.

Corresponding Author: Dr. Ana Martinho, Ph.D

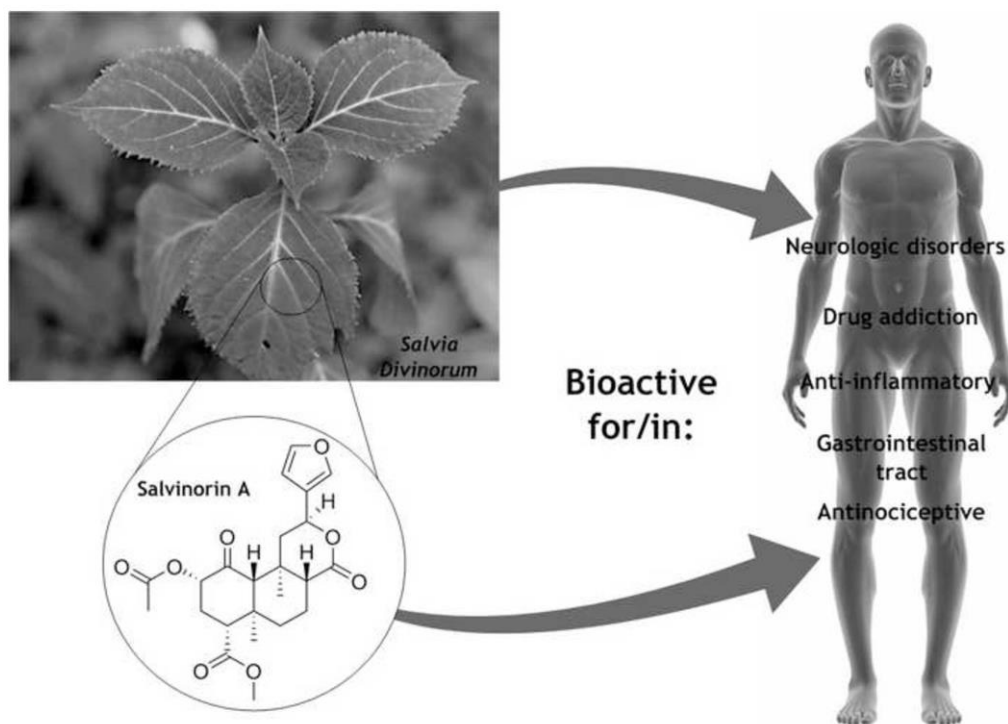
Corresponding Author's Institution: University of Beira Interior

First Author: André Cruz, Dr.

Order of Authors: André Cruz, Dr.; Sara Domingos, MS.c; Eugenia Gallardo, Ph.D; Ana Martinho, Ph.D

Abstract: Until the mid-60s, only the Mazatecs, an indigenous group from Oaxaca, Mexico, used Salvia Divinorum (*S. divinorum*) due to its hallucinogen properties. Later it was found that the hallucinogen effects of this plant were caused by the presence of a neoclerodane diterpene Salvinorin A (salvinorin A), which is a highly selective agonist of kappa-opioid receptor (KOR) that cause more intense hallucinations than the common hallucinogens as lysergic acid, mushrooms, ecstasy and others. In fact, smoking of only 200 to 500 µg of *S. divinorum* leaves is enough to produce these effects thus making it the most potent natural occurring hallucinogen known. Due to its legal status in various countries, this compound has gained a worldwide popularity as a drug of abuse with an easy access through smartshops and internet. Furthermore, salvinorin A gathered an increased interest in the scientific community thanks to its unique structure and properties, and various studies demonstrated that salvinorin A has antinociceptive, antidepressant and pro-depressant and anti-addictive effects that can be used in the treatment of a variety of human disorders and diseases, including depression, anxiety, schizophrenia and Alzheimer's disease.

*Graphical Abstract



*Highlights (for review)

Highlights

- Salvinorin A is the major constituent of *Salvia divinorum* and it is the responsible for the hallucinogenic properties of the plant.
- Salvinorin A is the most potent natural occurring hallucinogen and is a highly selective agonist of kappa-opioid receptor.
- Previous studies showed that salvinorin A has various biological effects and it presents a promisor role has a therapeutic agent, particularly in drug addiction, analgesia, inflammation and various neurologic and gastrointestinal disorders and/or pathologies.

Abstract

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Until the mid-60s, only the Mazatecs, an indigenous group from Oaxaca, Mexico, used *Salvia Divinorum* (*S. divinorum*) due to its hallucinogen properties.

Later it was found that the hallucinogen effects of this plant were caused by the presence of a neoclerodane diterpene Salvinorin A (salvinorin A), which is a highly selective agonist of *kappa*-opioid receptor (KOR) that cause more intense hallucinations than the common hallucinogens as lysergic acid, mushrooms, ecstasy and others. In fact, smoking of only 200 to 500 µg of *S. divinorum* leaves is enough to produce these effects thus making it the most potent natural occurring hallucinogen known.

Due to its legal status in various countries, this compound has gained a worldwide popularity as a drug of abuse with an easy access through smartshops and internet.

Furthermore, salvinorin A gathered an increased interest in the scientific community thanks to its unique structure and properties, and various studies demonstrated that salvinorin A has antinociceptive, antidepressant and pro-depressant and anti-addictive effects that can be used in the treatment of a variety of human disorders and diseases, including depression, anxiety, schizophrenia and Alzheimer's disease.

Keywords

Salvia divinorum, Salvinorin A, *Kappa*-opioid receptor, hallucinogen, therapeutics.

1. Introduction

Salvia is an important genus of the Lamiaceae (mint) family consisting of around 900 species. The name “*Salvia*” derives from a Latin word which means “to heal” (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2006).

S. divinorum (Figure 1), also known as “magic mint”, “diviner’s sage”, “Hierba Maria” and “Ska Maria Pastora”, is a small perennial shrub herbal species, native to the Mexican state of Oaxaca (Hernández-Bello et al., 2015; Turner, 2004; Wu et al., 2011). It is a psychoactive plant traditionally used by the Mazatecs for spiritual rituals, divination practices and various medicinal purposes. These include the use of small doses for the treatment of diarrhea, swollen belly, headaches and rheumatism. It is also used as an infusion or juice as a palliative agent. Additionally, Mazatecs use this plant for shamanic training and also for the training of medical apprenticeships (Casselmann et al., 2014; Valdés et al., 1983).

S. divinorum is consumed by chewing or drinking the juice obtained from the fresh leaves. Additionally, it may also be consumed through inhalation, volatilization or smoking dried leaves (Vortherms and Roth, 2006). It induces various cannabis-like effects, including the visual and auditory effects, perceptual modification, dizziness and uncontrolled laughter (Travis et al., 2012; Vortherms and Roth, 2006; Xavier Moreira et al., 2014).

The plant has undergone extensive phytochemical investigation and a number of compounds have been isolated (Table 1, Supplementary Information). Of these, the main constituent is salvinorin A, a non-nitrogenous diterpene, along with its desacetylated form, salvinorin B (Figure 2) (Harding et al., 2005; Tsujikawa et al., 2008). A range of other diterpenes has been isolated from *S. divinorum* such as salvinorin C-J, divinorins A-F, salvidivins A-D and salvinicins A and B (Table 1, Supplementary Information) (Bigham et al., 2003; Harding et al., 2005; Kutrzeba et al., 2009; Lee et al., 2005; Munro and Rizzacasa, 2002; Shirota et al., 2006; Tsujikawa et al., 2008; Valdés et al., 2001). However, it has been shown that salvinorin A is not only the major component but is also the main compound responsible for the bioactive properties of *S. divinorum* (Listos et al., 2011).

2. Salvinorin A, the major bioactive constituent of *S. divinorum*

2.1. Salvinorin A

The main properties of *S. divinorum* are attributed to salvinorin A, which is a potent and a highly selective KOR agonist (Roth et al., 2002). The other compounds present in the plant are at lower concentrations than salvinorin A, and it was shown by an *in silico* study in receptorome that their potential to be responsible for the psychoactive effects of the plant is not significant (Roth et al., 2004). Salvinorin A (Figure 2) presents a unique form of interaction with residues that are not required by conventional KOR peptide and non-peptide agonists (Yan et al., 2005).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The presence of a nitrogenous group was considered as a requirement for the interaction with the opioid receptor, which led to the developing of new opioid receptor probes and new properties (Cunningham et al., 2011). However, salvinorin A is structurally and chemically different from the classical hallucinogens, being the first known diterpene with psychoactive properties and a non-nitrogenous hallucinogen (Killinger et al., 2010). It has a molecular formula of $C_{23}H_{28}O_8$ (432 g.mol⁻¹) (Valdes III et al., 1984) and the IUPAC name is methyl(2S,4aR,6aR,7R,9S,10aS,10bR)-9-acetyloxy-2-(furan-3-yl)-6a,10b-dimethyl-4,10-dioxo-2,4a,5,6,7,8,9,10a-octahydro-1H-benzo[f]isochromene-7-carboxylate (PubChem, 2005). Analysis by EIMS of salvinorin A showed a mass spectrum with substantial fragments at m/z 94, 55, 121, 107, 273, 166, 220, 252, 234, 359, 318, 404 and 432 (Pentea et al., 2015).

It has been shown that smoking only 200 to 500 µg of salvinorin A induce short-lasting (up to 1h) intense hallucinations. Also, the authors observed that it is absorbed through the oral mucosa and in a small percentage through the salivary flow but in both cases it is enough to produce psychoactive effects. Furthermore, when it is smoked, its effects are much more pronounced and, on the contrary, when the contact with oral mucosa is minimized, it is mainly absorbed in the gastrointestinal tract and it is vastly inactivated (Siebert, 1994).

Salvinorin A has a fast elimination with a half-life of 75 min and a clearance of 26 L/h/Kg (Margalho et al., 2013). Studies carried out in blood samples of *Rhesus* monkeys demonstrated that salvinorin B is the most representative metabolite of salvinorin A, resulting from the ester hydrolysis at the 2-acetoxy group by an esterase (Margalho et al., 2013; Schmidt et al., 2005). This is probably why the hallucinogenic effect is short-lived. Hooker et al. (2008) synthesized [¹¹C]-labeled salvinorin A and conducted a positron emission tomography study, in order to measure its pharmacokinetics and distribution in the brain and peripheral organs of female primates. The results demonstrated an extremely rapid brain uptake, and the compound was distributed throughout the brain with a highest concentration in cerebellum. The kinetics of the peripheral organs suggested at least two modes of metabolism and excretion: renal and biliary (Fichna et al., 2009; Hooker et al., 2008).

Teksin et al. (2009) demonstrated that salvinorin A is a substrate for glycoprotein P (P-gp) *in vitro*. However, it has high potency, lipophilicity and permeability, which probably compensate the effect of P-gp-mediated efflux on CNS. The authors also observed that the salvinorin A concentrations substantially decreased after exposure to CYP2D6, CYP2C18, CYP1A1 and CYP2E1 enzymes, which support the fact that salvinorin A is a substrate for CYP450 enzymes. Glucuronosyltransferases also diminished salvinorin A levels, which might be related to the presence of an ester group, a putative site for glucuronidation (Teksin et al., 2009).

Typically, KOR agonists produce a decrease in locomotor activity, but salvinorin A induced it, suggesting the involvement of a different mechanism. Several studies have shown that salvinorin A is able to modify dopaminergic pathways through decreasing dopamine levels in the caudate putamen and dopamine neurotransmission levels in the dorsal striatum, mainly by regulation of dopamine release rather than its uptake. Indeed, in rats, salvinorin A has

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

been shown to be able to inhibit cocaine-induced seeking behavior (Listos et al., 2011). It also inhibits the release of dopamine from synaptosomes isolated from mouse striatum and prefrontal cortex and the release of serotonin, while it stimulates the release of noradrenaline from synaptosomes of the hippocampus. However, *in vivo* studies performed in rats demonstrated that salvinorin A decreased the extracellular concentrations of dopamine in the *nucleus accumbens* and had no effect on the concentration of serotonin. The same authors argued that an impairment of the mesolimbic dopaminergic pathway is involved in salvinorin A-induced dysphoria and a decrease in serotonin bioavailability might be responsible for the sedative effects of the compound (Zawilska and Wojcieszak, 2013).

Another study performed by Mowry *et al.* (2003), evaluated the toxicity of salvinorin A: rats were exposed to various concentrations of the drug for 2 weeks. At the end of the experiment, histological sections of spleen, brain, liver, kidney, blood and marrow bone showed no histological changes and toxicity for any of the doses of salvinorin A exhibited (Mowry et al., 2003). However a study *in vitro* in six cell lines, N 27, Caco 2, Hep G2, COS 7 and Hek 293 cells, revealed that salvinorin A cytotoxicity is both dose and time-dependent, which highlighted the relevance of performing further studies focused on the chronic and continuous consumption of *S. divinorum* (Martinho et al., 2015).

2.2. Bioactive effects of salvinorin A

2.2.1. Drug addiction

In general, drug addiction follows a cycle with three distinct stages: an initial binging stage where the consumers seek out ways to get the feeling of the drug; a second stage where the consumers undergo withdrawal symptoms; and then the anticipation stage which leads to further drug administration (Kivell et al., 2014).

The anti-addictive effect is one of the most relevant pharmacological effects of salvinorin A, already described in various behavioral studies, particularly those performed in rats. When rats were treated with low doses (0.1 - 40 µg/kg) of salvinorin A, the rewarding effects of the substance were demonstrated both in place preference and in self-administration tests. Otherwise, aversive effects were observed when rats were injected with a high dose of salvinorin A (160 µg/Kg) (Braidia et al., 2008).

Dopamine levels in nucleus accumbens have an important role in modulating the rewarding effects of drugs of abuse, food and sex (Nestler and Carlezon, 2006), and its regulation in this cerebral region may be the pathway underlying the behavioral effect of salvinorin A. It decreases dopamine levels in nucleus accumbens in rats (Ebner et al., 2010) and in caudate putamen in mice (Zhang et al., 2005). Therefore, salvinorin A could be used for the treatment of drug consumers due to its ability to decrease dopamine levels and its dopaminergic activation, related to self-administration of addictive drugs (Freeman et al., 2014). Another explanation for the potential use of salvinorin A in the treatment of drug addiction behaviour

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

is because salvinorin A shares many metabolic pathways with some drugs of abuse such as codeine and morphine (glucuronosyltransferase), oxycodone, MDMA, ketamine, THC (cytochrome p450 monooxygenase) and cocaine (carboxylesterase). This sharing could enhance drug-drug interactions which may have synergic or antagonic effects (Teksin et al., 2009). Supporting these hypotheses is a survey with 500 *S. divinorum* regular users which reported that only a non-significant minor percentage (0,6%) of users were feeling addicted or dependent to plant consumption (Baggott et al., 2004) and, till now, there are no case reports of addiction to *S. divinorum* (Johnson and Griffiths, 1996).

2.2.2. Antinociceptive effects

Other important pharmacological effect of salvinorin A is the antinociceptive effect associated with selective short-lived stimulation of KOR (up to 20 min) in the central nervous system demonstrated in mice tail-flick tests in a dose-dependent manner (McCurdy et al., 2006), antagonist of μ and δ opioid receptor did not affect the salvinorin A antinociceptive response highlighting that salvinorin A is pure KOR agonist (John et al., 2006).

In another study, a behavioral pain response to intracardiac injection of mustard oil were assessed in mice and showed that salvinorin A has antinociceptive properties when injected intraperitoneally (Fichna et al., 2012).

Opioid medication (OP) has been used for treatment pain with higher rate of success, but all medication has positive and negative effects. Some OP can cause dependence, breathing problems, overdose and even the need for higher stronger doses (Falla, 1999). Has described before, salvinorin A has antinociceptive effects and even more doesn't cause any dependence and has a safe physiological profile (Johnson et al., 2011), opening new sights for the development of new opioid painkillers.

2.2.3. Neurologic disorders

Previous studies and case reports have attributed antidepressant effects to salvinorin A. In a 26-year-old woman with chronic depression the antidepressant effect of *S. divinorum* was reported after smoking its leaves. Then, the patient orally consumed minimal doses of *S. divinorum* three times weekly by chewing the leaves and held them in the mouth for 15-30 minutes and, after 6 months, the symptoms had completely remised (Hanes, 2001). The antidepressant effect of salvinorin A was also confirmed in behavioral experiments in forced swim test in rats. At doses ranging from 0.001-1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, salvinorin A induced an antidepressant effect which was reversed by nor-binaltorphimine, a selective KOR antagonist (Braidia et al., 2009). However, in another study conducted in rats it was observed that a higher dose of salvinorin A (2.0 mg/Kg) produced a depressive effect, a decrease in locomotor activity and an attenuation of motivational behavior (Ebner et al., 2010). Thus, the authors

concluded that salvinorin A might be used in the treatment of depression-like effects at low doses.

salvinorin A also presents an anxiolytic effect in rats at doses ranging from 0.001 to 1000 µg/Kg, while at high doses (2 mg/Kg) a cognitive insufficiency similar to ketamine (also a potent KOR agonist) was produced, which implies that KOR may be possible involved in some cognitive alterations in psychiatric disorders such as schizophrenia (Braidia et al., 2009; Nemeth et al., 2015).

Furthermore, salvinorin A demonstrated a neuroprotective effect via KOR and modulates aquaporin 4 expression in cerebral ischemia-induced brain injury, preventing brain edema formation and inhibiting neuronal damage in hippocampus, cortex and striatum (Xin et al., 2016). Other KOR agonists showed neuroprotection but the side effects such as respiratory depression were not desirable; however the short acting and rapid onset of salvinorin A exhibits no respiratory depression making it a suitable agent for treatment of stroke, cardiac arrest or asphyxia (Su et al., 2012).

2.2.4. Gastrointestinal activity

Capasso *et al.* (2008) reported that salvinorin A inhibited gastrointestinal motility in mice accompanied by a gut inflammation (Capasso et al., 2008). In another study carried out in guinea-pig ileum, it was showed that salvinorin A induced inhibition of myenteric cholinergic transmission via KOR activation, suggesting that *S. divinorum*, and salvinorin A, may constitute a pharmacological basis for the treatment of diarrhea (Capasso et al., 2006). Mazatecs used this plant to treat diarrhea and they believed that could regulate eliminatory functions (Valdés et al., 1983).

2.2.5. Anti-inflammatory agent

Salvinorin A displayed an anti-inflammatory effect in two mouse models of colitis, mediated by KOR and cannabinoid receptor 1 (CB1) and produced analgesic effects in mice with acute intestinal inflammation (Fichna et al., 2012).

As described, salvinorin A is a selective agonist of KOR with no affinity for cannabinoid receptors (Roth et al., 2002). Thus, therewith somehow cannabinoid system is activated, may be through formation of KOR-CB1 receptor heterodimers or by influencing its intracellular signaling cascades. With this finding, new substances are being developed based on salvinorin A structure with mixed opioid/cannabinoid agonist properties that modulate physiological activity of both endogenous systems and could be more effective comparing to selective agonists (Fichna et al., 2012).

Macrophages are important cells in the surveillance of immune system that, when activated, produce bioactive molecules, as the potent inflammatory lipid mediator leukotriene. Leukotriene is involved in several inflammatory and autoimmune diseases

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

including asthma, allergic rhinitis and cardiovascular diseases. salvinorin A inhibited leukotriene production in activated macrophages through an unknown mechanism, involving enzymes and/or regulatory processes in leukotriene biosynthesis, suggesting a new mechanism for salvinorin A as anti-inflammatory agent and a possible natural-occurring substance for treatment of leukotriene-related diseases (Rossi et al., 2016).

3. Concluding Remarks

Although *S. divinorum* has been used for centuries for spiritual and medicinal purposes, its use as a recreational drug is a recent phenomenon. Its potent hallucinogenic activity and ready availability in smartshops and internet resulted in an increasing popularity worldwide, especially amongst young people, as a drug of abuse. Although the relatively safe profile of *S. divinorum*, the exact mechanism of action, metabolism, toxicity and long-term effects remain largely unclear.

Salvinorin A, the major bioactive compound of *S. divinorum*, represents a new class of non-nitrogenous KOR selective agonists, being the responsible for the psychoactive effects of the plant. In addition to its hallucinogenic activity, salvinorin A possesses antinociceptive, antidepressant and pro-depressant an anti-addiction effects and also acts in the gastrointestinal tract. Also, it showed beneficial effects in the treatment of a variety of mental disorders and some diseases including depression, anxiety, schizophrenia and Alzheimer's disease (Grundmann et al., 2007).

Salvinorin A showed a broad spectrum for therapeutic uses, starting as a substance for the treatment of human's drug addiction through the decreasing of dopamine levels and dopaminergic activation, related to self-administration of addictive drugs and owing to share similar metabolic pathway of abuse drugs leading to drug-drug interactions. Following, as possible therapeutic agent for treatment of depression or some psychiatric disorders and further as a suitable agent to treat cardiac and respiratory problems. Nevertheless, its anti-inflammatory properties show it as a promising agent for some autoimmune/inflammatory and even more salvinorin A affect indirect the cannabinoid system. Salvinorin A could also be used to treat gastrointestinal problems and pain suppression.

S. divinorum, and in the spotlight salvinorin A, demonstrated a great potential for human therapeutics because of the low toxicity profile, low dependence, safe physiological profile and several therapeutic targets; also, its chemical structure and consequently its effects have opened new perspectives and have led to the development of new compounds targeting KOR based on this chemical structure. Despite this, scientific community remains divided on whether this is, or not, a safe drug because of the extremely strong hallucinations that it produces turning it dangerous for human life following non-controlled consumption. Indeed, the putative toxicity promoted by long-term consumption of *S. divinorum* was not fully determined, thus, further research is of utmost interest in order to clarify this issue.

Both salvinorin A and *S. divinorum* became drugs of abuse thanks to their low cost, easy access and basic techniques to obtain salvinorin A from the whole plant. Nevertheless, the strong potential of this natural compound in human therapeutics should not be ruled out and new research lines focused on *S. divinorum* and salvinorin A should be further explored.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4. References

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Baggott, M., Erowid, E., Erowid, F., 2004. A survey of *Salvia divinorum* users. *Erowid Extr.* 6, 12-14.

Bigham, A.K., Munro, T.A., Rizzacasa, M.A., Robins-Browne, R.M., 2003. Divinatorins A-C, new neoclerodane diterpenoids from the controlled sage *Salvia divinorum*. *J. Nat. Prod.* 66, 1242-1244.

Braida, D., Capurro, V., Zani, A., Rubino, T., Viganò, D., Parolaro, D., Sala, M., 2009. Potential anxiolytic- And antidepressant-like effects of salvinorin A, the main active ingredient of *Salvia divinorum*, in rodents. *Br. J. Pharmacol.* 157, 844-853.

Braida, D., Limonta, V., Capurro, V., Fadda, P., Rubino, T., Mascia, P., Zani, A., Gori, E., Fratta, W., Parolaro, D., Sala, M., 2008. Involvement of kappa-opioid and endocannabinoid system on Salvinorin A-induced reward. *Biol. Psychiatry* 63, 286-292.

Capasso, R., Borrelli, F., Capasso, F., Siebert, D.J., Stewart, D.J., Zjawiony, J.K., Izzo, A.A., 2006. The hallucinogenic herb *Salvia divinorum* and its active ingredient salvinorin A inhibit enteric cholinergic transmission in the guinea-pig ileum. *Neurogastroenterol. Motil.* 18, 69-75.

Capasso, R., Borrelli, F., Zjawiony, J., Kutrzeba, L., Aviello, G., Sarnelli, G., Capasso, F., Izzo, A.A., 2008. The hallucinogenic herb *Salvia divinorum* and its active ingredient salvinorin A reduce inflammation-induced hypermotility in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 20, 142-148.

Casselmann, I., Nock, C.J., Wohlmuth, H., Weatherby, R.P., Heinrich, M., 2014. From local to global-fifty years of research on *Salvia divinorum*. *J. Ethnopharmacol.* 151, 768-83.

Cunningham, C.W., Rothman, R.B., Prisinzano, T.E., 2011. Neuropharmacology of the naturally occurring kappa-opioid hallucinogen salvinorin A. *Pharmacol. Rev.* 63, 316-47.

Ebner, S.R., Roitman, M.F., Potter, D.N., Rachlin, A.B., Chartoff, E.H., 2010. Depressive-like effects of the kappa opioid receptor agonist salvinorin A are associated with decreased phasic dopamine release in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl.)* 209, 241-252.

Falla, K., 1999. Opioid Medication Potential Risks and Complications [WWW Document]. URL <http://www.spine-health.com>

Fichna, J., Dickey, M., Lewellyn, K., Janecka, A., Zjawiony, J.K., Macnaughton, W.K., Storr, M.A., 2012. Salvinorin A Has Antiinflammatory and Antinociceptive Effects in Experimental Models of Colitis in Mice Mediated by KOR and CB1 Receptors. *Inflamm Bowel Dis* 18, 1137-1145.

Fichna, J., Schicho, R., Janeck, A., Zjawiony, J.K., Storr, M., 2009. Selective natural kappa opioid and cannabinoid receptor agonists with a potential role in the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Drug News Perspect.* 22, 383-392.

Freeman, K.B., Naylor, J.E., Prisinzano, T.E., Woolverton, W.L., 2014. Assessment of the kappa opioid agonist, salvinorin A, as a punisher of drug self-administration in monkeys.

- Psychopharmacology (Berl). 231, 2751-2758.
- 1
2 Grundmann, O., Phipps, S., Zadezensky, I., Butterweck, V., 2007. Salvia divinorum and
3 Salvinorin A: An Update on Pharmacology and Analytical Methodology. *Planta Med.* 73,
4 1039-1046.
5
6 Hanes, K.R., 2001. Antidepressant Effects of the Herb Salvia Divinorum: A Case Report. *J.*
7 *Clin. Psychopharmacol.* 21, 634-635.
8
9 Hanson, J.R., 2010. Natural products from the hallucinogenic sage. *Sci. Prog.* 93, 171-180.
10
11 Harding, W.W., Tidgewell, K., Schmidt, M., Shah, K., Dersch, C.M., Snyder, J., Parrish, D.,
12 Deschamps, J.R., Rothman, R.B., Prisinzano, T.E., 2005. Salvinicins A and B, new
13 neoclerodane diterpenes from Salvia divinorum. *Org. Lett.* 7, 3017-3020.
14
15 Hernández-Bello, R., García-Rodríguez, R.V., García-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L.M., Vázquez-
16 Hernández, M., Ramos-Morales, F.R., Corcoran, O., Sánchez-Medina, A., 2015. Salvinorin
17 A content in legal high products of Salvia divinorum sold in Mexico. *Forensic Sci. Int.*
18 249, 197-201.
19
20 Hooker, J.M., Xu, Y., Schiffer, W., Shea, C., Carter, P., Fowler, J.S., 2008. Pharmacokinetics
21 of the potent hallucinogen, salvinorin A in primates parallels the rapid onset, short
22 duration of effects in humans. *Neuroimage* 41, 1044-1050.
23
24 Imanshahidi, M., Hosseinzadeh, H., 2006. The pharmacological effects of Salvia species on the
25 central nervous system. *Phytother. Res.* 20, 427-37.
26
27 John, T.F., French, L.G., Erlichman, J.S., 2006. The antinociceptive effect of Salvinorin A in
28 mice. *Eur. J. Pharmacol.* 545, 129-133.
29
30 Johnson, M.W., Griffiths, R.R., 1996. Scientific Considerations Concerning Salvia Divinorum
31 and Salvinorin A: Implications for Proposed Legislation.
32
33 Johnson, M.W., MacLean, K.A., Reissig, C.J., Prisinzano, T.E., Griffiths, R.R., 2011. Human
34 psychopharmacology and dose-effects of salvinorin A, a kappa opioid agonist
35 hallucinogen present in the plant Salvia divinorum. *Drug Alcohol Depend.* 115, 150-155.
36
37 Killinger, B.A., Peet, M.M., Baker, L.E., 2010. Salvinorin A fails to substitute for the
38 discriminative stimulus effects of LSD or ketamine in Sprague-Dawley rats. *Pharmacol.*
39 *Biochem. Behav.* 96, 260-265.
40
41 Kivell, B.M., Ewald, A.W.M., Prisinzano, T.E., 2014. Salvinorin A analogs and other κ -opioid
42 receptor compounds as treatments for cocaine abuse, 1st ed, *Advances in*
43 *Pharmacology.* Elsevier Inc.
44
45 Kutrzeba, L.M., Ferreira, D., Zjawiony, J.K., 2009. Salvinorins J from Salvia Divinorum :
46 Mutarotation in the Neoclerodane System. *J. Nat. Prod.* 72, 1361-1363.
47
48 Lee, D.Y.W., Ma, Z., Liu-Chen, L.Y., Wang, Y., Chen, Y., Carlezon, W.A., Cohen, B., 2005.
49 New neoclerodane diterpenoids isolated from the leaves of Salvia divinorum and their
50 binding affinities for human kappa opioid receptors. *Bioorganic Med. Chem.* 13, 5635-
51 5639.
52
53 Listos, J., Merska, A., Fidecka, S., 2011. Pharmacological activity of Salvinorin A, the major
54 component of Salvia divinorum. *Pharmacol. Reports* 63, 1305-1309.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Margalho, C., Gallardo, E., Castanheira, A., Vieira, D.N., López-Rivadulla, M., Real, F.C., 2013. A validated procedure for detection and quantitation of salvinorin a in pericardial fluid, vitreous humor, whole blood and plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1304, 203-210.
- Martinho, A., Silva, S.M., Gallardo, E., 2015. Cytotoxic effects of salvinorin A, a major constituent of *Salvia Divinorum*. *J. Med. Chem.* 12, 432-440.
- McCurdy, C.R., Sufka, K.J., Smith, G.H., Warnick, J.E., Nieto, M.J., 2006. Antinociceptive profile of salvinorin A, a structurally unique kappa opioid receptor agonist. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 109-113.
- Mowry, M., Mosher, M., Briner, W., 2003. Acute Physiologic and Chronic Histologic Changes in Rats and Mice Exposed to the Unique Hallucinogen Salvinorin A. *J. Psychoactive Drugs* 35, 379-382.
- Munro, T. a, Rizzacasa, M. a, 2002. Salvinorins D-F, new neoclerodane diterpenoids from *Salvia divinorum*, and an improved method for the isolation of salvinorin A. *J. Nat. Prod.* 5-7.
- Nemeth, C.L., Paine, T.A., Rittiner, J.E., Béguin, C., Carrol, F.I., Roth, B.L., Cohen, B.M., Carlezon Jr, W.A., 2015. Role of kappa-opioid receptors in the effects of salvinorin A and ketamine on attention in rats. *Psychopharmacol. (Berl.)* 210, 263-274.
- Nestler, E.J., Carlezon, W.A., 2006. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biol. Psychiatry* 59, 1151-1159.
- Pentea, M., Butu, M., Samfira, I., Cristina, R.T., Butnariu, M., 2015. Extraction and Analytical Study of Salvinorin a From Leaves of *Salvia Divinorum*. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* 10, 291-297.
- PubChem, 2005. Salvinorin A [WWW Document]. URL https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salvinorin_A
- Rossi, A., Pace, S., Tedesco, F., Pagano, E., Guerra, G., Troisi, F., Werner, M., Roviezzo, F., Zjawiony, J.K., Werz, O., Izzo, A.A., Capasso, R., 2016. The hallucinogenic diterpene salvinorin A inhibits leukotriene synthesis in experimental models of inflammation. *Pharmacol. Res.* 106, 64-71.
- Roth, B.L., Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D., Rice, K.C., Steinberg, S., Ernsberger, P., Rothman, R.B., 2002. Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous kappa opioid selective agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11934-9.
- Roth, B.L., Lopez, E., Beischel, S., Westkaemper, R.B., Evans, J.M., 2004. Screening the receptorome to discover the molecular targets for plant-derived psychoactive compounds: A novel approach for CNS drug discovery. *Pharmacol. Ther.* 102, 99-110.
- Schmidt, M.S., Prisinzano, T.E., Tidgewell, K., Harding, W., Butelman, E.R., Kreek, M.J., Murry, D.J., 2005. Determination of Salvinorin A in body fluids by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 818, 221-225.
- Shirota, O., Nagamatsu, K., Sekita, S., 2006. Neo-clerodane diterpenes from the

- hallucinogenic sage *Salvia divinorum*. *J. Nat. Prod.* 69, 1782-1786.
- 1 Siebert, D.J., 1994. *Salvia divinorum* and salvinorin A: New pharmacologic findings. *J.*
2
3 *Ethnopharmacol.* 43, 53-56.
- 4 Su, D., Riley, J., Armstead, W., Liu, R., 2012. Salvinorin A Pretreatment Preserves
5 Cerebrovascular Autoregulation After Brain Hypoxic/Ischemic Injury via Extracellular
6 Signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase in Piglets. *Anesth. Analg.* 114,
7 200-204.
- 8
9
10 Teksin, Z.S., Lee, I.J., Nemieboka, N.N., Othman, A. a., Upreti, V. V., Hassan, H.E., Syed,
11 S.S., Priszano, T.E., Eddington, N.D., 2009. Evaluation of the transport, *in vitro*
12 metabolism and pharmacokinetics of Salvinorin A, a potent hallucinogen. *Eur. J. Pharm.*
13 *Biopharm.* 72, 471-477.
- 14
15
16 Travis, C.R., Ray, G. a., Marlowe, K.F., 2012. A Report of Nausea and Vomiting with
17 Discontinuation of Chronic Use of *Salvia divinorum*, *Case Reports in Medicine.*
- 18
19 Tsujikawa, K., Kuwayama, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Iwata, Y.T., Yoshida, T., Inoue,
20 H., 2008. Determination of salvinorin A and salvinorin B in *Salvia divinorum*-related
21 products circulated in Japan. *Forensic Sci. Int.* 180, 105-9.
- 22
23
24 Turner, D.M., 2004. Salvinorin - The Psychedelic Essence of *Salvia Divinorum*, *Essence.*
- 25
26 Valdés, L.J., Chang, H.M., Visger, D.C., Koreeda, M., 2001. Salvinorin C, a new neoclerodane
27 diterpene from a bioactive fraction of the hallucinogenic Mexican mint *Salvia divinorum*.
28 *Org. Lett.* 3, 3935-3937.
- 29
30 Valdés, L.J., Díaz, J.L., Paul, A.G., 1983. Ethnopharmacology of Ska María Pastora (*Salvia*
31 *Divinorum*, Epling and Játiva-M.). *J. Ethnopharmacol.* 7, 287-312.
- 32
33 Valdes III, L.J., Butler, W.M., Hatfield, G.M., Paul, A.G., Koreeda, M., 1984. Divinorin A, a
34 psychotropic terpenoid, and divinorin B from the hallucinogenic Mexican mint, *Salvia*
35 *divinorum*. *J. Org. Chem.* 49, 4716-4720.
- 36
37 Vortherms, T.A., Roth, B.L., 2006. Salvinorin A: from natural product to human therapeutics.
38 *Mol. Interv.* 6, 257-65.
- 39
40
41 Wu, L.-T., Woody, G.E., Yang, C., Li, J.-H., Blazer, D.G., 2011. Recent national trends in
42 *Salvia divinorum* use and substance-use disorders among recent and former *Salvia*
43 *divinorum* users compared with nonusers. *Subst. Abuse Rehabil.* 2011, 53-68.
- 44
45
46 Xavier Moreira, F., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., Guedes de Pinho, P., 2014. Analytical
47 investigation of legal high products containing *Salvia divinorum* traded in smartshops and
48 internet. *Forensic Sci. Int.* 242, 255-260.
- 49
50
51 Xin, J., Zhang, Y., He, Z., Wang, Z., 2016. Highly selective non-opioid kappa opioid receptor
52 (KOR) agonist salvinorin A protects against forebrain ischemia-induced brain injury in
53 rats. *Brain Res.* 1637, 168-176.
- 54
55 Yan, F., Mosier, P.D., Westkaemper, R.B., Stewart, J., Zjawiony, J.K., Vortherms, T.A.,
56 Sheffler, D.J., Roth, B.L., 2005. Identification of the molecular mechanisms by which
57 the diterpenoid salvinorin A binds to kappa-opioid receptors. *Biochemistry* 44, 8643-
58 8651.
- 59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Zawilska, J., Wojcieszak, J., 2013. *Salvia divinorum*: from Mazatec medicinal and hallucinogenic plant to emerging recreational drug. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 23, 403-412.

Zhang, Y., Butelman, E.R., Schlussman, S.D., Ho, A., Kreek, M.J., 2005. Effects of the plant-derived hallucinogen salvinorin A on basal dopamine levels in the caudate putamen and in a conditioned place aversion assay in mice: agonist actions at kappa opioid receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 179, 551-558.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Zawilska, J., Wojcieszak, J., 2013. *Salvia divinorum*: from Mazatec medicinal and hallucinogenic plant to emerging recreational drug. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 23, 403-412.

Zhang, Y., Butelman, E.R., Schlussman, S.D., Ho, A., Kreek, M.J., 2005. Effects of the plant-derived hallucinogen salvinorin A on basal dopamine levels in the caudate putamen and in a conditioned place aversion assay in mice: agonist actions at kappa opioid receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 179, 551-558.

List of Figures

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1. *Salvia divinorum* (adapted from <http://www.sagewisdom.org/>).

Figure 2. Chemical structure of Salvinorin A, the bioactive compound of *S. divinorum*. (adapted from (Hanson, 2010)).

List of Figures

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1. *Salvia divinorum* (adapted from <http://www.sagewisdom.org/>).

Figure 2. Chemical structure of Salvinorin A, the bioactive compound of *S. divinorum*. (adapted from (Hanson, 2010)).



Figure 1.

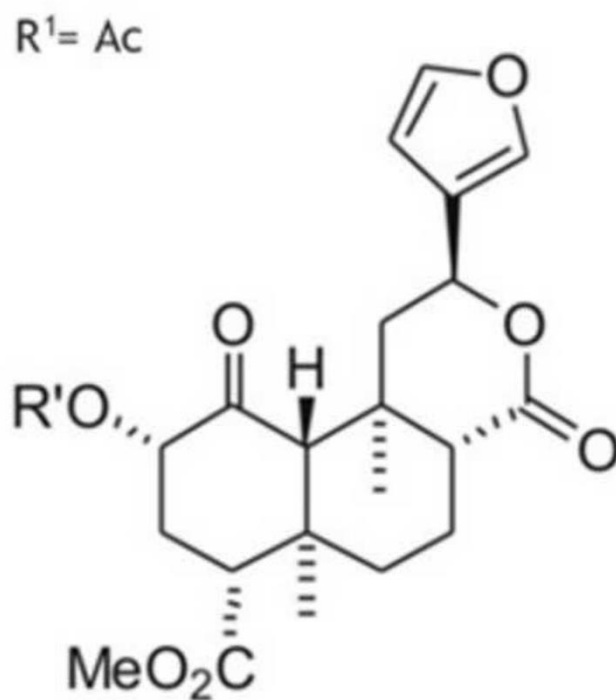


Figure 2.

Anexo III - Artigo original submetido para a Life Sciences: *In vitro* effects of salvinorin A in mRNA expression in hepatic cell lines

Elsevier Editorial System(tm) for Life
Sciences
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: In vitro effects of salvinorin A in mRNA expression in hepatic cell lines

Article Type: Full length article

Keywords: Salvia divinorum; Salvinorin A; Apo B100; Ces 1; Cyt C; CYP 1A2; CYP 2D6; CYP 3A4; UGT 1A1; hepatic cells; in vitro; cytotoxicity.

Corresponding Author: Dr. Ana Martinho, Ph.D

Corresponding Author's Institution: University of Beira Interior

First Author: André Cruz, Dr.

Order of Authors: André Cruz, Dr.; Eugenia Gallardo, Ph.D; Ana Martinho, Ph.D

Manuscript Region of Origin: PORTUGAL

Abstract: Salvinorin A (SA) is the main bioactive compound of *Salvia divinorum* (*S. divinorum*) and is the responsible for its hallucinogenic properties. Although the main biological effects of SA occurs in the central nervous system, little is known regarding its hepatic effects, where it is largely metabolized by various enzymes, particularly cytochrome P450 (CYP450), carboxylesterases (Ces) and uridine diphosphate glucuronosyltransferases (UGTs).

With this study we intended to screen the mRNA expression of some relevant genes both for this compound and/or other molecules in two hepatic models.

We evaluated the toxicity of SA after exposure to some concentrations of SA during various periods of time and tested its putative role in the regulation of mRNA expression of certain hepatic genes. The cytotoxicity of SA was accessed by MTT assays and mRNA expression by real-time PCR. Data showed that 50 μ M of SA significantly decreased the cellular viability (CV) in both cell lines. Also, 10 μ M of the compound was found to promote a significant decrease in CV in HepG2 cells, but only for longer periods. Also, the exposure cells to 1 μ M of SA altered the mRNA expression of the genes studied in a time of incubation and cell line dependent manner. Additionally, it was also found that Ces 1 is not expressed in WRL 68 cells as its mRNA was not detected.

Overall, our findings suggest that SA has a low toxicological profile but it should be monitored when consumed at high doses or when combined with certain target compounds.

Title: *In vitro* effects of salvinorin A in mRNA expression in hepatic cell lines

André Cruz, Eugenia Gallardo and Ana Martinho*

CICS-UBI – Health Sciences Research Centre of University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique,
6200-506 Covilhã, Portugal

* Corresponding author and to whom reprint requests should be addressed:

Ana Martinho, Ph.D
CICS – UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior
Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal.
Tel: +351 275329002
E-mail: anamartinho@fcsaude.ubi.pt

Introduction

Salvia divinorum (*S. divinorum*) is a hallucinogenic plant native from Oaxaca, México, commonly used by Mazatecs [1]. Many substances were isolated from the plant: salvinorin A (SA) to J [2–5], divinorin A to F [3,5], salvidivin A to D [3], salvinicin A to B [6]. SA is a neoclerodane diterpen and is the main bioactive compound responsible for the hallucinogenic properties of *S. divinorum* [2,7]. To achieve intense hallucinogenic effects the most effective forms of consumption include oral absorption in doses ranging from 200 to 500 µg and its vaporization and inhalation [7]. SA has a rapid onset and reaches the central nervous systems (CNS) very quickly due to its high lipophilicity and low molecular weight, which facilitate its crossing through the brain blood barrier and distribution within the brain, in higher levels in the cerebellum and visual cortex [8,9].

Structurally, SA is different from all known hallucinogens, as it is the first naturally occurring compound with high selectivity for *kappa* opioid receptors (KOR), a target of psychotropic compounds [10], which belong to opioid system and are widely expressed in the peripheral and CNS [11]. SA has a fast distribution and a half-life ($t_{1/2}$) of 56,6 min [12] and is metabolized by various enzymes including cytochrome P450 (CYP450) [8], carboxylesterases (Ces) [13] and uridine diphosphate glucuronosyltransferases (UGTs) [8].

Previous studies showed that SA has a great potential and a safe physiological profile for therapeutic usage, as previous studies showed that it prevents drug addiction [14–18], acts in various neurologic disorders [19–22], treats some gastrointestinal issues [23,24] and presents antinociceptive [25,26] and anti-inflammatory properties [26,27].

The biological effects of SA are poorly understood and, till now, previous the few works revealed that it mainly targets the CNS, however, its putative hepatic effects are largely unknown. In fact, there is no data regarding SA effects on the expression of apolipoprotein B100 (Apo B100), carboxylesterase 1 (Ces 1), CYP450 1A2 (CYP 1A2), CYP450 2D6 (CYP 2D6), CYP450 3A4 (CYP 3A4), cytochrome C (Cyt C) and UGT 1A1 (UGT 1A1).

Apo B100 is an essential protein for the assembly and hepatic secretion of very low density lipoproteins (vLDL) produced by hepatocytes [28,29]. It promotes tissue uptake of low density lipoprotein (LDL) from the plasma when interact with LDL receptors and plasma concentration is correlated with risk of coronary artery disease [28]. Some genetic disorders, as familial hypercholesterolemia and familial defective Apo B100, are associated with high levels of LDL accumulated in plasma due to LDL receptor mutations or LDL to LDL-receptor binding [30].

Cyt C is a free heme protein located in the inner membrane of mitochondria, highly soluble and essential to the electron transport chain [31,32]. It is also an intermediary molecule in apoptosis in developing cells and in responses to stimuli or DNA damage. When released from mitochondria through cell membrane it is responsible for the activation of caspase 9 which activates caspase 3 and 7 that lead to cell death [31].

As mentioned, the structure of SA reveals that it could regulate, and be metabolized, by certain enzymes, including Ces 1, CYP 1A2, CYP 3A4, UGT 1A1 and CYP 2D6 [8].

Ces are enzymes of a group of serine esterases responsible for the metabolism of certain drugs and other compounds [33]. They mostly convert lipophilic ester substrates into more water-soluble carboxylic acids

in order to facilitate their elimination. Human Ces 1 is an enzyme belonging to Ces family with a wide substrate specificity for esters, cleaving them into small esters, thioesters and amide esters [34]. It is expressed in various tissues but mainly in liver where it has a pivotal role in the metabolism of xenobiotics and other compounds [35].

The CYP450 family includes several enzymes mostly involved in human drug metabolism [36]. This family of a mixed-function of monooxygenase enzymes is responsible for the phase I oxidative metabolism of various compounds and for the increasing of substrate hydrophilicity for further conjugation reaction of phase 2 enzymes. Approximately 90% of human drugs are metabolized by six main cytochrome isoforms: CYP 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 and 3A4/5 [37]. Also, some substrates are activated following CYP450 metabolism which could generate toxic metabolites or mutagenicity [38]. The cytochrome CYP 1A2 is almost exclusively expressed in the liver [36] and its expression is particularly induced by cigarette smoking and some barbecued or charbroiled food. Various compounds are described to be metabolized by this isoform including: theophylline, caffeine, imipramine, paracetamol and phenacitin. Furthermore, a previous study showed that CYP 1A2 is also involved in carcinogen bioactivation [36]. The CYP 3A4 is one of the main human CYP450 enzymes and has a major role in drug metabolism as it is responsible for the metabolism of more than 50% of xenobiotics and drugs commercially available [36,38]. It is particularly expressed in liver (25-30%) [36] and prostate, and in a lesser extend in intestine epithelium, bile duct, nasal mucosa, kidney, adrenal cortex, gastric mucosa, gallbladder and in intercalated ducts of the pancreas [40]. The CYP 2D6 is mainly expressed in the liver and it is also involved in drug metabolism [36], including anti-arrhythmic, antidepressants, anesthetics and analgesics [37].

The UGTs are enzymes belonging to the UGT family that act in the conjugation with glucuronic acid, also known as glucuronidation, in the phase II reactions, which integrate the clearance and detoxification reactions for a large number of xenobiotics [41,42]. These enzymes are mainly expressed in the liver and promote the increase of the hydrophilicity of substrates thus facilitating their biliary or renal elimination [42,43]. This family is divided into 2 gene families (UGT 1 and UGT 2) and subfamilies. UGT 1A, UGT 2 and UGT 2B [43]. UGT 1A1 is the most studied form due to its genetic variability and relevance in the bilirubin clearance [44].

Taken together, to reveal if SA consumption has any physiological consequence, in particular in the hepatic system and to figure out which are the possible impact of *S. divinorum* consumption in human health is of utmost interest and, thus, the aim of this study is to ascertain its effects *in vitro* in two hepatic cell lines, in particular on the expression of certain genes related with drug metabolism.

Material and methods

Salvinorin A stock solution

One milligram (1 mg) of SA (SA; Sigma Aldrich, Inc.) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, Inc.) and 0,1% HCl 0,1 M (Merck Millipore).

Cell cultures

The two cell lines used in this study were HepG2 (human hepatocellular carcinoma cells) and WRL 68 (human fetal hepatic cells).

HepG2 and WRL 68 cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and were cultured in 75 or 175 cm² culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, Inc.), 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich, Inc.) and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, Inc.) and maintained in a humidified air incubator at 37 °C 5% CO₂.

For both cell lines, the medium was renewed every 2–3 days until cells reached confluence.

Cell treatments

When cultures reached approximately 90-95% confluence, cells were trypsinized from the cultured flasks, quantified by the trypan-blue assay and seeded in quadruplicated 96-well culture plates (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays - MTT assay) and duplicated in 6-well culture plates (real-time PCR assays – RT-PCR assay). HepG2 and WRL 68 were seeded at $2,5 \times 10^4$ (MTT) and 4×10^5 cells/well (real-time PCR) and left to adhere and to grow in appropriate medium. After reaching 85-90% confluence the medium was substituted for the correspondent serum-free medium and left for 12 h. After this period, cells were incubated with SA, in appropriate serum-free medium, at 0, 0,1, 1, 10 and 50 µM for 12, 24, 36, 48 and 72 h for MTT assays and for RT-PCR at 0 and 1 for 12, 24 and 72 h. The DMSO was always kept below 0,1% to prevent the cytotoxicity induced by this solvent. For all assays each experiment was repeated in triplicate and in three independent experiments.

MTT cell viability assay

In vitro cytotoxicity was evaluated by MTT assay (Sigma-Aldrich, Inc.) as described previously [45]. Briefly, after the incubation of cells with each concentration for 12, 24, 36, 48 or 72h, the medium was removed and 200 µL of phosphate buffer saline (PBS) were added to wash the cells. Then, 100 µL of MTT solution (0,5 mg/mL) in serum-free correspondent medium were added to cells, in the dark, for 60-120 min at 37 °C. After, the MTT-containing solution was removed from wells and the formazan crystals were dissolved in 40 mM HCl solution in isopropanol. After a 5 min of incubation in the, the solution was transferred to a new multiwell plate and the absorbance was measured at 570 nm using a microplate

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

reader EZ Read 400 (Biochrom). Each experiment was performed in triplicate and repeated in three independent experiments.

Total mRNA extraction and real-time PCR

Total mRNA extraction was performed according to described by Martinho *et al.* (2012) [46] with minor modifications. Briefly, total mRNA was extracted from cells using TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Inc), following the manufacturer's instructions. Total mRNA of each sample was quantified using Nanophotometer (Implen, Munich, Germany) and 1 µg was reverse transcribed for 1 h at 37 °C in a 20 µL reaction solution containing 10X RT Buffer (Nzytech), 25 pmol of random hexamer mix (Nzytech), 0.5 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP; Nzytech), 0,1 M dithiothreitol (DTT) and 200 U NZY reverse transcriptase (Nzytech).

The mRNA levels of Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, 2D6, 3A4, Cyt C and UGT 1A1 in HepG2 and WRL 68 cells were analyzed by real-time PCR in cells incubated with 0 and 1 of SA for 12, 24 and 72 h. The human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as endogenous control gene. Sequences of all PCR primers used are indicated in table I.

To analyze the mRNA expression of genes in both cell lines, reactions were carried out using the conditions indicated in table II in a 20 µL-reaction tube. The amplification conditions used for each cell line and for each gene are mentioned in the table III.

The amplified PCR fragments were checked by melting curves: reactions were heated from 55 to 95 °C with 10 s hold at each decreasing cDNA concentrations (1:1; 1:10; 1:100 and 1:1000) and the reaction efficiencies were calculated. Real-time PCR was carried out using the iCycler IQ System (Bio-Rad) and fluorescence was measured after each cycle. Every reaction was done, at minimum, in triplicate and each experiment was performed in three independent times.

Statistical analysis

The percentage of cellular viability relative to controls (CV) was determined and expressed as mean ± standard deviation, using the formula:

$$CV = (\text{Average of the absorbance of quadruplicate treated cells} / \text{Average of the absorbance of control cells}) \times 100 \%$$

Data obtained was compared by means of a two-tailed unpaired Student's *t* test and were considered statistically significant for a *p*-value lower than 0.05 ($p < 0,05$).

The data collected from real-time PCR experiments were analyzed using the mathematical model proposed by Pfaff: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [47], which allows the determination of differences in expression levels between control and treated cells, taking into account reaction efficiency and reference gene normalization.

Results

Evaluation of SA-mediated cytotoxicity

This work aimed to evaluate the *in vitro* toxicity of SA and to compare it in the two hepatic cell lines. So assess it, MTT assays were performed and the relative cellular viability (CV) in HepG2 (Figure 1) and WRL 68 (Figure 2) cells after incubation with SA for 12, 24, 36, 48 and 72 h were determined.

The results showed that the incubation of HepG2 cells with 0,1 and 1 μ M SA promote no cytotoxicity while the incubation with both 10 and 50 μ M of SA are cytotoxic to these cells as their cellular viability decreased comparing to control.

Regarding the WRL-68 cells, as showed in figure 2, the incubation with 0,1, 1 and 10 μ M of SA did not decreased the cellular viability of these cells. Otherwise, data showed that 50 μ M are cytotoxic for WRL-68 cells for incubations longer than 12 h as the CV decreased to approximately one half (24 h: $69,46 \pm 6,03$; 36 h: $63,72 \pm 5,48$; 48 h: $50,01 \pm 4,46$ and 72 h: $49,71 \pm 2,14$).

Evaluation of SA effect on gene expression

Real-time PCR assays were performed in HepG2 and WRL 68 in order to evaluate the mRNA expression of Apo B100, Ces 1, Cyt C, CYP 1A2, 2D6, 3A4 and UGT 1A1 after incubation during 12, 24 and 72 h with 0 and 1 μ M SA.

In HepG2 cells, data (Figure 3) showed that the relative mRNA expression of both Apo B100 and Ces 1 is slightly increased after an incubation with SA for both 12 h ($1,3 \pm 0,0$) and 24 h ($1,2 \pm 0,0$). Similarly, the relative Cyt C mRNA expression after 12 h of incubation with SA doubled ($2,3 \pm 0,1$) but decreased after 24 h of incubation with the compound ($0,4 \pm 0,1$), returned to its basal levels after 72h. Also, UGT 1A1 gene expression increased to approximately two times after a 24 h SA incubation ($1,9 \pm 0,4$) and decreased after 72 h to approximately one half ($0,6 \pm 0,2$).

Regarding mRNA CYP450 expression, results showed that after 12 h of incubation with SA there is an increase of the relative mRNA expression of CYP 1A2 ($2,9 \pm 0,8$) and CYP 2D6 ($3,3 \pm 0,4$). After 24 h of incubation with the compound, the relative mRNA expression of all CYP450 isoforms decreased dramatically to approximately one half and, after 72 h of incubation, the relative mRNA expression remained decreased, except for CYP 2D6, that returned to basal mRNA expression levels.

As showed in figure 4, in WRL 68 cells the relative mRNA expression of Apo B100 and CYP 3A4 increased after 12 h of incubation with SA ($1,5 \pm 0,4$ and $2,2 \pm 0,3$, respectively) and returned to basal levels after a 24- or 72 h-incubation. In relation to Cyt C mRNA expression results showed that with the exception of 24 h, which there was observed no alterations, the incubation of WRL 68 with SA promoted an increase in its relative expression both after 12 h ($0,6 \pm 0,0$) and 72 h ($0,5 \pm 0,0^*$).

Also, data showed that CYP 1A2 mRNA expression was increased after 24 h ($1,2 \pm 0,0$) and 72 h ($1,8 \pm 0,0$) of incubation with SA. Otherwise, CYP 2D6 mRNA expression was not altered at any time point studied. Regarding the UGT 1A1, it was observed that its mRNA expression was increased almost 4X ($3,7 \pm 1,1$) after 12 h of incubation with SA and dramatically decreased after 24 h ($0,6 \pm 0,2$) and 72 h

($0,1 \pm 0,0^*$). For Ces 1 gene there were no data obtained as it was observed no Ces 1 mRNA expression in these cells.

Discussion

Martinho *et al.* (2015) evaluated the SA *in vitro* cytotoxicity in various cell lines and observed that it is dose-, cell- and time- depend [45]. Similarly, here we observed a similar profile as it was showed that 50 μM of SA is cytotoxic to both cell lines and 10 μM of the compound induced also a significant decreased in the cellular viability of cells, in particular, for longer periods of incubation.

A previous study reported that to achieve hallucinogenic effects *S. divinorum* needs to be consumed at around 200 to 500 μg [7] which, considering the percentage of SA present in the plant, it was observed that the concentrations included in this study are consistent with the typically used by its consumers and the lower cytotoxic concentration in both cell lines is included in the usual range consuming concentrations (10 μM corresponding to 432 μg of SA and 216 μg of *S. divinorum* leaf).

Overall, MTT assays showed that 50 μM of SA is cytotoxic at any period of time and for both cell lines and 10 μM promoted a decrease in the cellular viability of HepG2, indicating that, in general, HepG2 are more sensitive to SA than WRL 68 cells.

Apo B100 encodes for an essential protein involved in lipid metabolism, in the secretion and formation of LDL, and a decrease in its expression is linked to some pathologies, as hypercholesterolemia [30]. According to our results, SA was showed to increase Apo B100 mRNA expression, in a cell- and time-dependent manner, which could promote an increase in LDL levels and a decrease of HDL concentration in plasma [48]. However more studies are needed to fully understand SA implication on lipid metabolism as in red wine polyphenolics substances increase LDL receptor expression and suppress Apo B100 secretion lowering cholesterol levels in HepG2 [49].

Ces 1 is a very important enzyme in metabolism of xenobiotic and other endogenous compounds that could be harmful to organism [35]. After HepG2 cells exposure to SA, the relative mRNA expression of Ces 1 slightly increased, which could have an impact in the metabolism of toxic, thus accelerating it. In WRL 68 cells, this enzyme was found to be no expression. At this point, our results highlight the importance of the selection of the cell line to perform *in vitro* studies indicating that, depending on the gene to study, cells could be a suitable, or not, biological model.

Regarding the Cyt C, it is a protein involved in cellular respiration and it plays a main role in apoptosis. In fact, cellular respiration is very important to cell survival and Cyt C is pivotal to this process [50]. In the case of WRL 68 cells, it was observed a significant decrease in the Cyt C mRNA expression after incubation with 1 μM of SA for 12 h, which was counteracted after 24 h to approximately 2x comparing to control and, after 72 h, it drastically decreased again to approximately one half. In HepG2 cells, in general, the same profile was observed but it was increased after 12 h of incubation with SA and decreased after 24h returning to basal levels at 72h. Considering the relevance of this protein in organism, it would be considered that SA may lead to a higher or shorter cell, time-dependent, thus causing an impact in apoptosis which, depending on cell type, could be benefic or harmful.

References

- [1] L.J. Valdés III, G.M. Hatfield, M. Koreeda, A.G. Paul, Studies of *Salvia divinorum* (Lamiaceae), an Hallucinogenic Mint from the Sierra Mazateca in Oaxaca, Central Mexico, *Econ. Bot.* 41 (1987) 283–291.
- [2] L.J. Valdés III, W.M. Butler, G.M. Hatfield, A.G. Paul, M. Koreeda, Divinorin A, a psychotropic terpenoid, and divinorin B from the hallucinogenic Mexican mint, *Salvia divinorum*, *J. Org. Chem.* 49 (1984) 4716–4720.
- [3] O. Shirota, K. Nagamatsu, S. Sekita, Neo-clerodane diterpenes from the hallucinogenic sage *Salvia divinorum*, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 1782–1786.
- [4] L.M. Kutzraba, D. Ferreira, J.K. Zjawiony, Salvinorins J from *Salvia Divinorum*: Mutarotation in the Neoclerodane System, *J. Nat. Prod.* 72 (2009) 1361–1363.
- [5] D.Y.W. Lee, Z. Ma, L.Y. Liu-Chen, Y. Wang, Y. Chen, W.A. Carlezon, B. Cohen, New neoclerodane diterpenoids isolated from the leaves of *Salvia divinorum* and their binding affinities for human kappa opioid receptors, *Bioorganic Med. Chem.* 13 (2005) 5635–5639.
- [6] W.W. Harding, K. Tidgewell, M. Schimdt, K. Shah, C.M. Dersch, J. Snyder, D. Parrish, J.R. Deschamps, R.B. Rothman, T.E. Prisinzano, Salvinicins A and B, New Neoclerodane Diterpenes from *Salvia Divinorum*, *Org. Lett.* 7 (2005) 3017–3020.
- [7] D.J. Siebert, *Salvia divinorum* and salvinorin A: New pharmacologic findings, *J. Ethnopharmacol.* 43 (1994) 53–56.
- [8] Z.S. Teksin, I.J. Lee, N.N. Nemieboka, A.A. Othman, V. V. Upreti, H.E. Hassan, S.S. Syed, T.E. Prisinzano, N.D. Eddington, Evaluation of the transport, *in vitro* metabolism and pharmacokinetics of Salvinorin A, a potent hallucinogen., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (2009) 471–477.
- [9] J.M. Hooker, Y. Xu, W. Schiffer, C. Shea, P. Carter, J.S. Fowler, Pharmacokinetics of the potent hallucinogen, salvinorin A in primates parallels the rapid onset, short duration of effects in humans., *Neuroimage.* 41 (2008) 1044–1050.
- [10] B.L. Roth, K. Baner, R. Westkaemper, D. Siebert, K.C. Rice, S. Steinberg, P. Ernsberger, R.B. Rothman, Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous kappa opioid selective agonist., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 11934–9.
- [11] L. Lalanne, G. Ayranci, B.L. Kieffer, P.-E. Lutz, The kappa opioid receptor: from addiction to depression, and back., *Front. Psychiatry.* 5 (2014) 1–17.
- [12] M. Schmidt, M.S. Schmidt, E.R. Butelman, W.W. Harding, K. Tidgewell, D.J. Murry, M.J. Kreek, T.E. Prisinzano, Pharmacokinetics of the plant-derived kappa-opioid hallucinogen salvinorin A in nonhuman primates, *Synapse.* 58 (2005) 208–210.
- [13] M.S. Schmidt, T.E. Prisinzano, K. Tidgewell, W. Harding, E.R. Butelman, M.J. Kreek, D.J. Murry, Determination of Salvinorin A in body fluids by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization, *J. Chromatogr. B.* 818 (2005) 221–225.
- [14] D. Braidà, V. Limonta, V. Capurro, P. Fadda, T. Rubino, P. Mascia, A. Zani, E. Gori, W. Fratta,

- D. Parolaro, M. Sala, Involvement of kappa-opioid and endocannabinoid system on Salvinorin A-induced reward, *Biol. Psychiatry*. 63 (2008) 286–292.
- [15] S.R. Ebner, M.F. Roitman, D.N. Potter, A.B. Rachlin, E.H. Chartoff, Depressive-like effects of the kappa opioid receptor agonist salvinorin A are associated with decreased phasic dopamine release in the nucleus accumbens, *Psychopharmacology (Berl)*. 210 (2010) 241–252.
- [16] Y. Yan, D. Yang, E.D. Zarnowska, Z. Du, B. Werbel, C. Valliere, R.A. Pearce, J.A. Thomson, S.-C. Zhang, Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells., *Stem Cells*. 23 (2005) 781–790.
- [17] M. Baggott, E. Erowid, F. Erowid, A survey of Salvia divinorum users, *Erowid Extr.* 6 (2004) 12–14.
- [18] M.W. Johnson, R.R. Griffiths, Scientific Considerations Concerning Salvia Divinorum and Salvinorin A: Implications for Proposed Legislation, 1996.
- [19] K.R. Hanes, Antidepressant Effects of the Herb Salvia Divinorum: A Case Report, *J. Clin. Psychopharmacol.* 21 (2001) 634–635.
- [20] D. Braida, V. Capurro, A. Zani, T. Rubino, D. Viganò, D. Parolaro, M. Sala, Potential anxiolytic and antidepressant-like effects of salvinorin A, the main active ingredient of Salvia divinorum, in rodents, *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 844–853.
- [21] C.L. Nemeth, T.A. Paine, J.E. Rittiner, C. Béguin, F.I. Carrol, B.L. Roth, B.M. Cohen, W.A. Carlezon Jr, Role of kappa-opioid receptors in the effects of salvinorin A and ketamine on attention in rats, *Psychopharmacol. (Berl)*. 210 (2015) 263–274.
- [22] D. Su, J. Riley, W. Armstead, R. Liu, Salvinorin A Pretreatment Preserves Cerebrovascular Autoregulation After Brain Hypoxic/Ischemic Injury via Extracellular Signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase in Piglets, *Anesth. Analg.* 114 (2012) 200–204.
- [23] R. Capasso, F. Borrelli, M.G. Cascio, G. Aviello, K. Huben, J.K. Zjawiony, P. Marini, B. Romano, V. Di Marzo, F. Capasso, A.A. Izzo, Inhibitory effect of salvinorin A, from Salvia divinorum, on ileitis-induced hypermotility: cross-talk between kappa-opioid and cannabinoid CB(1) receptors, *Br. J. Pharmacol.* 155 (2008) 681–689.
- [24] R. Capasso, F. Borrelli, F. Capasso, D.J. Siebert, D.J. Stewart, J.K. Zjawiony, A.A. Izzo, The hallucinogenic herb Salvia divinorum and its active ingredient salvinorin A inhibit enteric cholinergic transmission in the guinea-pig ileum, *Neurogastroenterol. Motil.* 18 (2006) 69–75.
- [25] T.F. John, L.G. French, J.S. Erlichman, The antinociceptive effect of Salvinorin A in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 545 (2006) 129–133.
- [26] J. Fichna, M. Dickey, K. Lewellyn, A. Janecka, J.K. Zjawiony, W.K. Macnaughton, M.A. Storr, Salvinorin A Has Antiinflammatory and Antinociceptive Effects in Experimental Models of Colitis in Mice Mediated by KOR and CB1 Receptors, *Inflamm Bowel Dis.* 18 (2012) 1137–1145.
- [27] A. Rossi, S. Pace, F. Tedesco, E. Pagano, G. Guerra, F. Troisi, M. Werner, F. Roviezzo, J.K. Zjawiony, O. Werz, A.A. Izzo, R. Capasso, The hallucinogenic diterpene salvinorin A inhibits leukotriene synthesis in experimental models of inflammation, *Pharmacol. Res.* 106 (2016) 64–71.

- [28] E.A. Fisher, M. Zhou, D.M. Mitchell, X. Wu, S. Omura, H. Wang, A.L. Goldberg, H.N. Ginsberg, The degradation of apolipoprotein B100 is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway and involves heat shock protein 70., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 20427–20434.
- [29] T. Gautier, S. Becker, V. Drouineaud, F. Ménétrier, P. Sagot, J.-R. Nofer, S. von Otte, L. Lagrost, D. Masson, U.J.F. Tietge, Human luteinized granulosa cells secrete apoB100-containing lipoproteins, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 2245–2252.
- [30] J. Borén, I. Lee, W. Zhu, K. Arnold, S. Taylor, T.L. Innerarity, Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective Apo-B100, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 1084–1093.
- [31] M. Akaberi, S. Mehri, M. Iranshahi, Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species, *Fitoterapia.* 100 (2015) 118–132.
- [32] J. Cai, J. Yang, D.P. Jones, Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c, *Biochim. Biophys. Acta.* 1366 (1998) 139–149.
- [33] R. Humerickhouse, K. Lohrbach, L. Li, W.F. Bosron, M.E. Dolan, Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2, *Cancer Res.* 60 (2000) 1189–1192.
- [34] M.R. Brzezinski, B.J. Spink, R.A. Dean, C.E. Berkman, J.R. Cashman, W.F. Bosron, Human liver carboxylesterase hCE-1: Binding specificity for cocaine, heroin, and their metabolites and analogs, *Drug Metab. Dispos.* 25 (1997) 1089–1096.
- [35] C.D. Fleming, S. Bencharit, C.C. Edwards, J.L. Hyatt, L. Tsurkan, F. Bai, C. Fraga, C.L. Morton, E.L. Howard-Williams, P.M. Potter, M.R. Redinbo, Structural insights into drug processing by human carboxylesterase 1: Tamoxifen, mevastatin, and inhibition by benzil, *J. Mol. Biol.* 352 (2005) 165–177.
- [36] F.P. Guengerich, Human Cytochrome P450 Enzymes, in: *Cytochrome P450 Struct. Mech. Biochem.*, 2015: pp. 523–785.
- [37] Z. Bibi, Role of cytochrome P450 in drug interactions, *Nutr. Metab. (Lond).* 5 (2008) 1–10.
- [38] G. Smith, M.J. Stubbins, L.W. Harries, C.R. Wolf, Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily, *Biomed. Res.* 28 (1998) 1129–1165.
- [39] F.P. Guengerich, Cytochrome P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999) 1–17.
- [40] X. Ding, L.S. Kaminsky, Human Extrahepatic Cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43 (2003) 149–173.
- [41] A. Rowland, K.M. Knights, P.I. Mackenzie, J.O. Miners, The “albumin effect” and drug glucuronidation: Bovine serum albumin and fatty acid-free human serum albumin enhance the glucuronidation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 substrates but not UGT1A1 and UGT1A6 activities, *Drug Metab. Dispos.* 36 (2008) 1056–1062.
- [42] L. Iyer, D. Hall, S. Das, M.A. Mortell, J. Ramirez, S. Kim, A. Di Rienzo, M.J. Ratain, Phenotype-genotype correlation of *in vitro* SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism, *Clin. Pharmacol. Ther.* 65 (1999) 576–582.

- [43] S.C. Marques, O.N. Ikediobi, The clinical application of UGT1A1 pharmacogenetic testing: gene-environment interactions, *Hum. Genomics*. 4 (2010) 238–249.
- [44] M.B. Fisher, M. Vandenbranden, K. Findlay, B. Burchell, Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank, *Pharmacogenetics*. 10 (2000) 727–739.
- [45] A. Martinho, S.M. Silva, E. Gallardo, Cytotoxic effects of salvinorin A, a major constituent of *Salvia Divinorum*, *J. Med. Chem.* 12 (2015) 432–440.
- [46] A. Martinho, I. Gonçalves, M. Costa, C.R. Santos, Stress and glucocorticoids increase transthyretin expression in rat choroid plexus via mineralocorticoid and glucocorticoid receptors., *J. Mol. Neurosci.* 48 (2012) 1–13.
- [47] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR., *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2003–2007.
- [48] S.P.A. McCormick, J.K. Ng, M. Véniant, J. Borén, V. Pierotti, L.M. Flynn, D.S. Grass, A. Connolly, S.G. Young, Transgenic Mice that Over express Mouse Apolipoprotein B, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 11963–11970.
- [49] S. Pal, N. Ho, C. Santos, P. Dubois, J. Mamo, K. Croft, E. Allister, Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells, *J. Nutr.* 133 (2003) 700–706.
- [50] M. Hüttemann, P. Pecina, M. Rainbolt, T.H. Sanderson, V.E. Kagan, L. Samavati, J.W. Doan, I. Lee, The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: from respiration to apoptosis, *Mitochondrion*. 11 (2011) 369–381.
- [51] J. George, M. Murray, K. Byth, G.C. Farrell, Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease, *Hepatology*. 21 (1995) 120–128.
- [52] K. Sumida, M. Kawana, E. Kouno, T. Itoh, S. Takano, T. Narawa, R.H. Tukey, R. Fujiwara, Importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 expression in skin and its induction by UVB in neonatal hyperbilirubinemia., *Mol. Pharmacol.* 84 (2013) 679–686.

List of Tables

Table I. Primer sequences of human ApoB100 (hApo B100), Carboxylesterase 1 (hCes 1), cytochrome P450 1A2 (hCYP 1A2), 2D6 (hCYP 2D6), 3A4 (hCYP 3A4), cytochrome C (hCyt C) and uridine diphosphate glucuronosyltransferases 1A1 (hUGT 1A1) in real-time PCR experiments.

Table II. Reaction conditions used for each gene (Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, Cyt C, GAPDH and UGT 1A1) in each cell line (HepG2 and WRL 68).

Table III. Amplification conditions used for each gene (Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, Cyt C, GAPDH and UGT 1A1) in each cell line (HepG2 and WRL 68).

List of Figures

Figure 1. Cellular viability of HepG2 cell line after exposure to 0 (control), 0,1, 1, 10 and 50 μM of SA for 12, 24, 36, 48 and 72 h: a) Data is expressed as the mean \pm standard error and differences between treated and control groups were determined by Student's *t* test and considered significant when $p < 0,05(*)$; b) Graphical representation of data.

Figure 2. Cellular viability of WRL 68 cell line after exposure to 0 (control), 0,1, 1, 10 and 50 μM of SA for 12, 24, 36, 48 and 72 h: a) Data is expressed as the mean \pm standard error and differences between treated and control groups were determined by Student's *t* test and considered significant when $p < 0,05(*)$; b) Graphical representation of data.

Figure 3. Relative mRNA expression of Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 and UGT 1A1 in HepG2 cell line after exposure to 0 (control) and 1 μM of SA for 12, 24 and 72 h: a) Data is expressed as the mean \pm standard error and differences between treated and control groups were determined by Student's *t* test and considered significant when $p < 0,05(*)$; b) Graphical representation of data.

Figure 4. Relative mRNA expression of Apo B100, Ces 1, Cit. C, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4 and UGT 1A1 in WRL 68 cell line after exposure to 0 (control) and 1 μM of SA for 12, 24 and 72 h: a) Data is expressed as the mean \pm standard error and differences between treated and control groups were determined by Student's *t* test and considered significant when $p < 0,05(*)$; b) Graphical representation of data.

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

Table I

Table I. Primer sequences of human apolipoprotein B100 (hApo B100), carboxylesterase 1 (hCes 1), cytochrome P450 1A2 (hCYP 1A2), 2D6 (hCYP 2D6), 3A4 (hCYP 3A4), cytochrome C (hCyt C) and

| Primer Designation | Sequence 5'-3' |
|--------------------|--------------------------------|
| hApo B100 fw | atc cac atc acct cc aaa gc |
| hApo B100 rv | ctg agg ctg tcc aca ctg aa |
| hCes 1 fw | gca tct ggg gat tct tca gc |
| hCes 1 rv | ttc tcc tcc cgc tga etc tc |
| hCYP 1A2 fw | ctg ggc act teg acc ctt ac |
| hCYP 1A2 rv | gca gga ac caca gga acc tc |
| hCYP 3A4 fw | ccg agt gga ttt cct tca gc |
| hCYP 3A4 rv | agg tgg gtg gtg cct tat tg |
| hCYP 2D6 fw | tct ctt gga caa agc cgt ga |
| hCYP 2D6 rv | gct ggg ata tgc agg agg ac |
| hCyt C fw | cct cag gga gag gtg get tt |
| hCyt C rv | agc cca agc aaa gag gga ac |
| hGAPDH fw | cgc cag ccg agc cac atc |
| hGAPDH rv | cgc cca ata cga cca aat ccg |
| hUGT 1A1 fw | cct tgc etc aga att cct tc |
| hUGT 1A1 rv | att gat ccc aaa gag aaa acc ac |

uridine diphosphate glucuronosyltransferases 1A1 (hUGT 1A1) in real-time PCR experiments.

Table II

Table I. Reaction conditions used for each gene (Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, Cyt C, GAPDH and UGT 1A1) in each cell line (HepG2 and WRL 68).

| Gene | Reaction conditions |
|---------------|--|
| HepG2 | |
| Apo B100 | 10 µL SYBR Green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| Ces 1 | 10 µL SYBR Green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1,5 µL cDNA (1:1) |
| CYP 1A2 | 10 µL SYBR Green, 2,5 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| CYP 2D6 | 10 µL SYBR Green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| CYP 3A4 | 10 µL SYBR Green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| Cyt C | 10 µL SYBR Green, 2 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| GAPDH | 10 µL SYBR Green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| UGT 1A1 | 10 µL SYBR Green, 5 pmol primer Fw e Rv; 1,5 µL cDNA (1:1) |
| WRL 68 | |
| Apo B100 | 10 µL SYBR Green, 4 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| Ces 1 | 10 µL SYBR Green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1,5 µL cDNA (1:1) |
| CYP 1A2 | 10 µL SYBR Green, 4 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| CYP 2D6 | 10 µL SYBR Green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| CYP 3A4 | 10 µL SYBR Green, 4 pmol primer Fw e Rv; 1,5 µL cDNA (1:1) |
| Cyt C | 10 µL SYBR Green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| GAPDH | 10 µL SYBR Green, 3 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |
| UGT 1A1 | 10 µL SYBR Green, 5 pmol primer Fw e Rv; 1 µL cDNA (1:1) |

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

Table III

Table I. Amplification conditions used for each gene (Apo B100, Ces 1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, Cyt C, GAPDH and UGT 1A1) in each cell line (HepG2 and WRL 68).

| Gene | Amplification conditions |
|---------------|--|
| HepG2 | |
| Apo B100 | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| Ces 1 | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 64 °C; 30 sec a 72 °C) |
| CYP 1A2 | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| CYP 2D6 | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| CYP 3A4 | 3 min a 95 °C; 45 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| Cyt C | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| GAPDH | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| UGT 1A1 | 3 min a 95 °C; 45 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 60 °C; 30 sec a 72 °C) |
| WRL 68 | |
| ApoB100 | 3 min a 95 °C; 45 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 60 °C; 30 sec a 72 °C) |
| Ces 1 | 3 min a 95 °C; 45 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| CYP 1A2 | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| CYP 2D6 | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| CYP 3A4 | 3 min a 95 °C; 45 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| Cyt C | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| GAPDH | 3 min a 95 °C; 40 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 63 °C; 30 sec a 72 °C) |
| UGT 1A1 | 3 min a 95 °C; 45 cycles (15 sec a 95°C; 30 sec a 60 °C; 30 sec a 72 °C) |

Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinatorina A na expressão hepática de genes

Figure 1

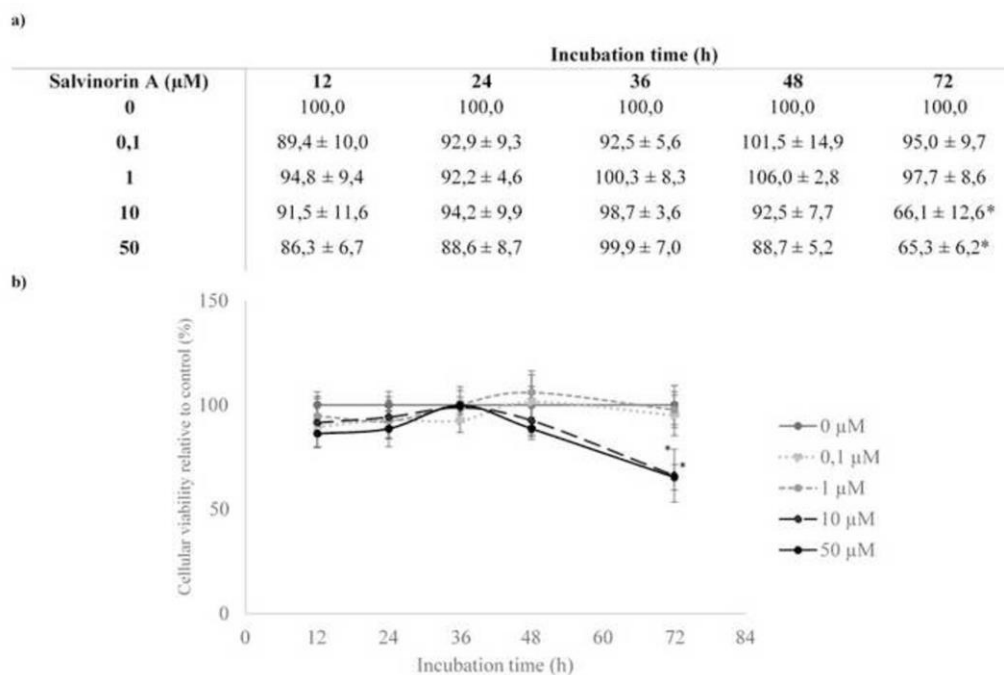
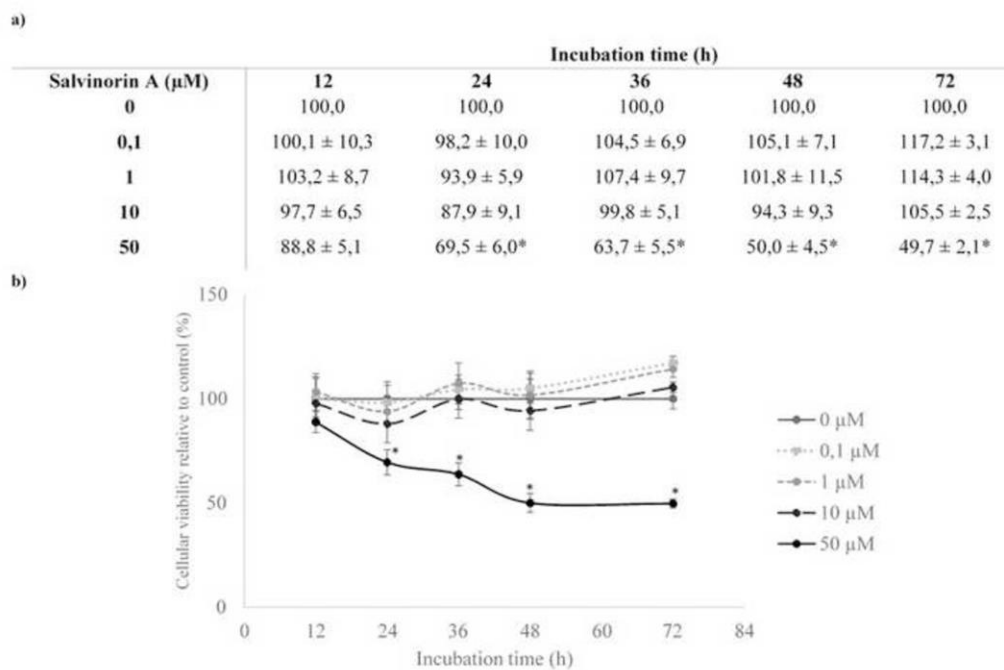


Figure 2



Estudo *in vitro* dos efeitos de salvinorina A na expressão hepática de genes

Figure 3

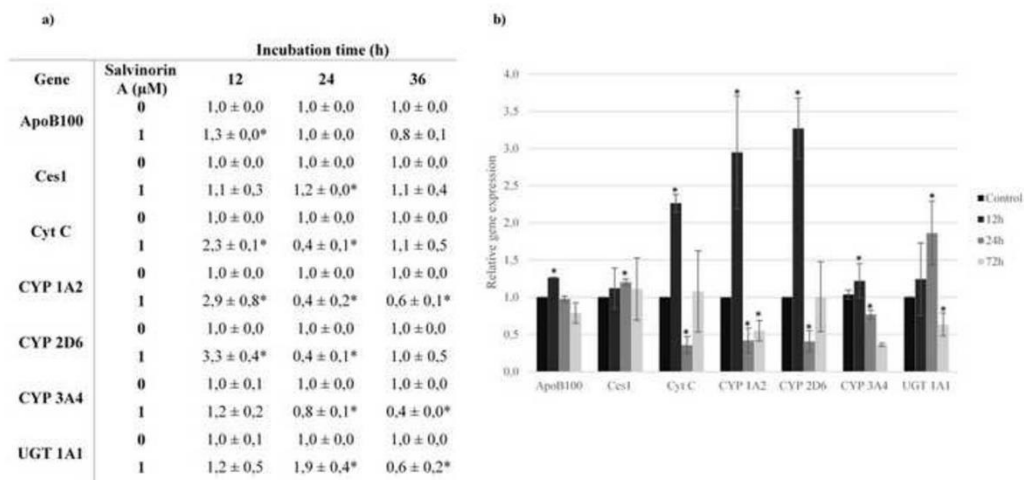


Figure 4

