

## AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TINTURA DE THUYA OCCIDENTALIS

Guilherme Souza Firpo<sup>1</sup>; Gabriel da Silva Zani<sup>2</sup>; Renata Gressler<sup>3</sup>;  
Sílvia de Oliveira Hubner<sup>4</sup>; Marcelo de Lima<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – UFPel – guilhermefirpo@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – UFPel – gzani27@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – UFPel – repierobomgressler@gmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – UFPel – hubner@ufpel.edu.br

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – UFPel – mdelima.ufpel@gmail.com

### 1. Introdução

A *Thuya occidentalis*, é uma árvore nativa da Europa, da família Cupressaceae, utilizada amplamente em homeopatia e fitoterapia humana e veterinária. Diversos estudos têm indicado potenciais atividades imunoestimulantes e antivirais (EMEA, 1999; Naser et al., 2005). A *Thuya occidentalis* é muito utilizada na medicina humana para o tratamento de verrugas e condilomas na pele e nas mucosas, sendo que os pacientes se recuperam de dois a seis meses após o uso contínuo do medicamento (Marins et al, 2006). Mais recentemente, vem sendo utilizada no tratamento do câncer, no entanto, seu mecanismo de ação ainda permanece desconhecido (Torres et al.; 2016). Na Medicina Veterinária, sua utilização mostrou ser uma alternativa eficiente, rápida e com um valor econômico bem acessível para o tratamento da papilomatose canina (Queiroz et al., 2015).

Estudos *in vitro* sobre suas ações, demonstraram um aumento da proliferação de linfócitos T e da produção de IL-2, a ação antiviral também foi relatada, a partir da inibição do HIV-1, *in vitro*, e experimentos *in vivo* em camundongos demonstraram o aumento significativo de granulócitos segmentados e imaturos, células do baço e leucócitos, particularmente do tipo CD-4 (EMEA, 1999; Naser et al., 2005), indicando um potencial ação imunoestimulante. TORRES et al., (2016) estudaram os efeitos das frações de *Thuya* sobre o glioblastoma usando modelos *in vitro* e *in vivo*. E verificaram que a fração  $\alpha/\beta$ -tujona diminuiu a viabilidade celular e exibiu potentes efeitos antiproliferativos, pró-apoptóticos e antiangiogênicos *in vitro*. Ensaios *in vivo* mostraram que  $\alpha/\beta$ -tujona promoveu a regressão da neoplasia e inibiu os marcadores angiogênicos VEGF, Ang-4 e CD31 no tumor.

Caruntu et al. (2020) listaram suas atividades biológicas ou propriedades como antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e

hepatoprotetora. E seus constituintes (da planta desidratada) foram agrupados (por esses autores) da seguinte forma: Óleos essenciais (Borneol, Canfeno, Fenchona, Limoneno, Myriceno,  $\alpha$ -Terpeno, Terpinoleno, Thujona (85%  $\alpha$ -thujona e 15%  $\beta$ -thujona), sendo este o composto principal (0,76-2,4%); Cumarinas (Ácido  $p$ -Cumarínico e Umbelliferona); Flavonoides (Kaempferol, Kaempferoll-3-O- $\alpha$ -ramnosídeo, Mearnisitrina, Myricetrina, Myricitrina, Quercetina, Quercitrina); Taninos (Catequina e galocatequina) e Proantocianidinas (Procianidina B-3 e Prodelfinidina).

Entretanto, é importante ressaltar que ainda existe uma carência de estudos experimentais sobre a utilização da *Thuya occidentalis* como agente antiviral. Alguns estudos sugerem que sua atividade antiviral estaria relacionada com a estimulação da resposta imune, porém estudos devem ser realizados para a confirmação desta hipótese (QUEIROZ et al., 2015). Caruntu et al. (2020), afirmam que não existem muitos estudos que tenham avaliado a atividade pró e/ou anti-inflamatória dos componentes de *T. occidentalis*.

A resposta inflamatória envolve, entre outras células, a participação de macrófagos, que, residentes nos tecidos, funcionam como células sentinelas que identificam a presença de microrganismos e/ou alterações celulares e respondem secretando citocinas que iniciam e depois amplificam (macrófagos ativados) a resposta protetora contra os microrganismos e/ou promovem a destruição celular (Abbas, 2022). Quando ativados, os macrófagos secretam diferentes citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e interleucinas, que participam na regulação de diversas reações durante o processo inflamatório, agindo sobre diferentes células e tecidos (Tizard, 2014). Algumas dessas citocinas atuam nas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos para aumentar o recrutamento de monócitos e outros leucócitos do sangue para locais de infecções (Abbas, 2022).

Tendo em vista a escassez de dados sobre a atividade imunomoduladora da tintura de *Thuya occidentalis*, este estudo terá como objetivo estudar a expressão de citocinas em linhagens contínuas de macrófagos submetidos a diferentes concentrações do seu extrato.

## 2. Objetivos

- Determinar os níveis de expressão das citocinas IL-1, IL-6, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , em linhagens de macrófagos submetidos a diferentes concentrações da tintura de *Thuya occidentalis*.

### 3. Metodologia

Todos os experimentos serão desenvolvidos no Laboratório de Virologia e Imunologia (LABVIR) da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas.

Inicialmente, serão realizados testes de citotoxicidade *in vitro* com a tintura de *Thuya occidentalis*, adquirida de fornecedor comercial. Para este fim, serão estabelecidos os cultivos celulares das linhagens de macrófagos. As linhagens celulares que serão utilizadas serão a J774 e RAW 264 (ambas linhagens de macrófagos murinos), com as quais a equipe do LABVIR já tem experiência na condução e realização de estudos. Após o estabelecimento do cultivo celular, as células serão submetidas a diferentes concentrações do extrato em diferentes tempos de incubação. Após incubação, as células serão congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA. Após, o DNA complementar (cDNA) serão submetidos a qPCR para avaliação da expressão gênica das citocinas IL-1, IL-6, IL-12, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , e outras utilizando *primers* específicos. As reações serão realizadas no equipamento *StepOne Plus*®. Os resultados observados serão submetidos a análise estatística para a comparação entre os tratamentos e os controles.

### 4. Resultados esperados e perspectivas futuras

Atualmente, o projeto se encontra em fase de aquisição de reagentes e padronização das técnicas a serem utilizadas no estudo. No entanto, são esperados resultados promissores que indiquem diferenças importantes na expressão das diferentes citocinas em linhagem de macrófagos tratados ou não com extratos de *Thuya occidentalis*. Os resultados irão permitir, pelo menos parcialmente, um avanço no entendimento do mecanismo de ação imunomodulador do extrato em questão. Experimentos futuros poderão incluir a avaliação dos extratos em outras linhagens celulares, visando a complementação dos resultados e/ou elucidação do seu mecanismo de ação.

## 5. Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H., PILLAI S.; **Cellular and Molecular Immunology 10th edition**, Elsevier 2022. INTERNATIONAL EDITION ISBN: 978-0-323-75749-2

CARUNTU, Sonia; CICEU, Alina; OLAH, Neli Kinga; DON, Ioan; HERMENEAN, Anca and COTORACI, Coralia; Thuja occidentalis L. (Cupressaceae): Ethnobotany, Phytochemistry and Biological Activity; **Molecules** 2020.  
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules25225416>

EMEA, **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**; Thuja occidentalis, 1999. Disponível em : [https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/thuja-occidentalis-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/thuja-occidentalis-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf)

MARINS, R.S.Q.S. et al. Avaliação da eficácia da homeopatia e fitoterapia no tratamento da papilomatose cutânea bovina. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v.13, n.1, p. 10-12, 2006.

NASER, B.; BODINET C.; TEGTMEIER, M.; LINDEQUIST, U.; Thuja occidentalis (Arbor vitae): A Review of its Pharmaceutical, Pharmacological and Clinical Properties. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2005; Mar;2(1):69-78. doi: 10.1093/ecam/neh065.

QUEIROZ, F. F., RODRIGUES, A. B. F., DI FILIPPO, P. A., ALMEIDA, A. J., & SILVEIRA, L. S.. (2015). Thuya occidentalis CH12 como tratamento alternativo da papilomatose canina. **Revista Brasileira De Plantas Mediciniais**, 17(4), 945–952.  
<https://doi.org/10.1590/1983-084X/14111>

TIZARD, I R; **Imunologia veterinária** / Ian R. Tizard; tradução Luciana Medina, Mateus D. Luchese. 9ª ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2014

TORRES, A.; VARGAS, Y.; URIBE, D.; CARRASCO, C.; TORRES, C.; ROCHA, R.; OYARZUN, C.; MARTIN, R.S.; QUEZADA, C. Pro-apoptotic and anti-angiogenic properties of the  $\alpha/\beta$ -thujone fraction from Thuja occidentalis on glioblastoma cells. **J. Neurooncol**. 2016, 128, 9–19