

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES E ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA TINTURA DE *THUYA OCCIDENTALIS*

GUILHERME SOUZA FIRPO¹; GABRIEL DA SILVA ZANI²;
RENATA GRESSLER³; CESAR VALMOR ROMBALDI⁴
GEFERSON FISCHER⁵; MARCELO DE LIMA⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – UFPel – guilhermefirpo@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – UFPel – gzani27@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – UFPel – repierobomgressler@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – UFPel – cesarvrf@ufpel.edu.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas – UFPel – geferson@ufpel.edu.br

⁶ 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 (NASER *et al.*, 2005). Suas atividades biológicas, ou propriedades, são descritas como antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e hepatoprotetora; e os constituintes (da planta desidratada) são os óleos essenciais: [Borneol, Canfeno, Fenchona, Limoneno, Myriceno, α -Terpeno, Terpinoleno, Thujona (85% α -thujona e 15% β -thujona)]; Cumarinas (Ácido p -Cumarínico e Umbelliferona); Flavonoides (Kaempferol, Kaempferoll-3-O- α -ramnosídeo, Mearnisitrina, Myricetrina, Myricitrina, Quercetina, Quercitrina); Taninos (Catequina e galocatequina) e Proantocianidinas (Procianidina B-3 e Prodelfinidina) CARUNTU *et al.* (2020).

A *T. occidentalis* é muito utilizada na medicina humana para o tratamento de verrugas e condilomas na pele e nas mucosas e, mais recentemente, vem sendo utilizada no tratamento do câncer, embora o exato mecanismo de ação ainda seja desconhecido (TORRES *et al.*; 2016). Na Medicina Veterinária, sua utilização mostrou ser uma alternativa eficiente, rápida e com um valor econômico acessível para o tratamento da papilomatose canina (QUEIROZ *et al.*, 2015).

Estudos *in vitro* têm demonstrado um aumento da proliferação de linfócitos T e da produção de IL-2 bem como uma atividade antiviral pela demonstração da inibição do HIV-1, *in vitro*. Experimentos *in vivo*, em camundongos, demonstraram o aumento significativo de granulócitos segmentados e imaturos, esplenócitos e leucócitos, particularmente, CD4⁺ (NASER *et al.*, 2005), indicando potencial ação imunoestimulante. Em estudo dos efeitos das frações de *T. occidentalis* sobre o

glioblastoma, foi verificado que a fração α/β -tujona diminuiu a viabilidade celular e exibiu potentes efeitos antiproliferativos, pró-apoptóticos e antiangiogênicos *in vitro*; e os ensaios *in vivo* mostraram que α/β -tujona promoveu a regressão da neoplasia e inibiu marcadores angiogênicos como o VEGF, Ang-4 e CD31+ nas células tumorais (TORRES *et al.*, 2016).

Os fibroblastos são uma linhagem celular predominantemente mesenquimal que é responsável por definir a topologia dos tecidos através da deposição e remodelamento de proteínas da matriz extracelular (MEC), embora também se destaquem pela elevada capacidade de síntese de quimiocinas e fatores de crescimento celular (BUECHLER *et al.*, 2020); já os macrófagos são células que atuam em processos de reconhecimento, fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas (FRANKLIN, 2021). Essas citocinas e quimiocinas medeiam o recrutamento de células imunes e estimulam mecanismos de controle de sinalização intracelular que caracterizam o processo inflamatório (TURNER *et al.*, 2014).

Diante da falta de informações mais detalhadas acerca da atividade imunomoduladora da tintura de *T. occidentalis*, este estudo teve como objetivo identificar os constituintes químicos da tintura e determinar suas concentrações citotóxicas em linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos J929. Estas informações serão essenciais para uma próxima etapa do projeto que irá envolver a avaliação da expressão *in vitro* de citocinas específicas que permitam um avanço no entendimento do potencial imunoestimulante de extratos da *T. occidentalis*.

2. Metodologia

Todos os experimentos envolvendo o cultivo de linhagens celulares foram desenvolvidos no Laboratório de Virologia e Imunologia (LABVIR) da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). A análise de cromatografia da tintura de *T. occidentalis* foi realizada no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPEL.

Inicialmente, foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* com a tintura de *Thuya occidentalis*, adquirida de fornecedor comercial (*Thuya occidentalis* a 20%, solvente hidroalcoólico, extração por percolação/maceração, Lote 14043-2, SM Empreendimentos Farmacêuticos, SP - Brasil). Para este fim, foram estabelecidos os cultivos celulares das linhagens de macrófagos RAW 264.7 e Fibroblastos L929 (ambas linhagens de murinos), do banco de células do LABVIR. Após o estabelecimento do cultivo celular, as células foram submetidas a diferentes

concentrações da tintura (800mcg, 400mcg, 200mcg, 150mcg, 100mcg, 50mcg e 25mcg) em diferentes tempos de incubação (24 e 48 horas). Após, foram realizados ensaios de citotoxicidade pelo método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil brometo de tetrazólio), seguido da leitura das densidades ópticas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

3. Resultados preliminares e discussão

A análise cromatográfica qualitativa da tintura usada no estudo demonstrou a presença de componentes já previamente descritos na literatura: catequina, rutina, quercetina e kaempferol, ácido cafeico e ácido ferúlico.

Nos ensaios de viabilidade celular pelo método de MTT, foi observado que as concentrações de 800 µg/mL e 400 µg/mL apresentaram efeito citotóxico com viabilidade celular foi de 35% e 68%, respectivamente, na linhagem RAW 264.7. Já em células L929, a viabilidade celular foi de 46% e 65%, respectivamente, quando comparados aos controles. As concentrações de 200 µg/mL, 150 µg/mL e 100 µg/mL não foram citotóxicas. Após 48 horas de incubação, a viabilidade celular foi de 94%, 88% e 126% em RAW 264.7, e de 77%, 78% e 87% em células L929, respectivamente (Figura 1). As concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL resultaram em viabilidade celular inferior a 70% em ambas as linhagens, motivo pelo qual foram descartadas das análises subsequentes.

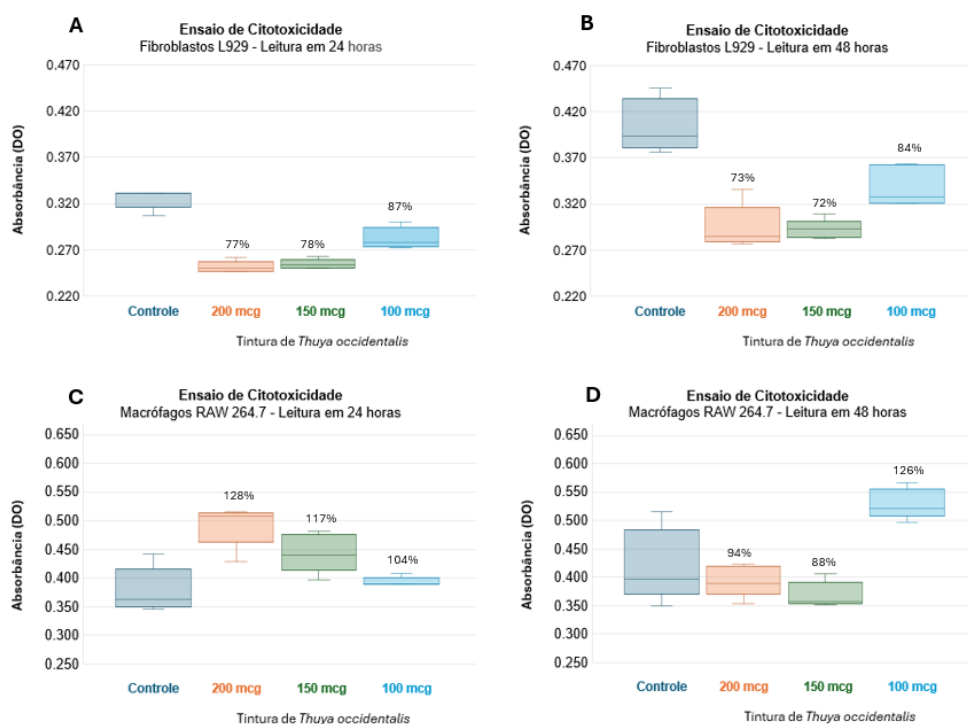


Figura 1: (A) Valores de absorbância em linhagem L929, após 24 horas de incubação*. (B) Valores de absorbância em linhagem L929, após 48 horas de incubação*. (C) Valores de absorbância em linhagem RAW 264.7, após 24 horas de incubação*. (D) Valores de absorbância em linhagem RAW 264.7, após 48 horas de incubação*. *n=5 repetições. Valores percentuais em relação à média do controle.

4. Conclusão

Os resultados parciais demonstraram a identificação e confirmação dos componentes do extrato utilizado. A concentração de 100mcg/mL foi identificado como ideal para a continuidade dos experimentos *in vitro* devido à ausência de citotoxicidade em linhagens celulares de macrófagos e fibroblastos. Experimentos futuros serão conduzidos no sentido de avaliar a expressão de citocinas específicas em diferentes linhagens celulares, permitindo um avanço no entendimento do mecanismo de imunomodulação da *Thuja occidentalis*.

5. Referências

- BUECHLER, M. B., FU, W., TURLEY, S. J.; Fibroblast-macrophage reciprocal interactions in health, fibrosis, and cancer. Department of Cancer Immunology, Genentech. **Elsevier Inc** 2021. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.04.021
- CARUNTU, S., CICEU, A., OLAH, N. K., DON, I., HERMENEAN, A., COTORACI, C.; Thuja occidentalis L. (Cupressaceae): Ethnobotany, Phytochemistry and Biological Activity; **Molecules** 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25225416>
- FRANKLIN, R.A.; Fibroblasts and macrophages: Collaborators in tissue homeostasis. **Immunol Rev.** 2021 Jul;302(1):86-103. doi: 10.1111/imr.12989. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34101202.
- 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. Thuja 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>
- 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 α/β -thujone fraction from Thuja occidentalis on glioblastoma cells. **J. Neurooncol.** 2016, 128, 9–19. DOI: 10.1007/s11060-016-2076-2. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26900077.
- TURNER, M.D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D.J.; Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1843, Issue 11, 2014, Pages 2563-2582, ISSN 0167-4889, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>.