

ESTUDO DO EFEITO DO MEDICAMENTO DINAMIZADO *Thuja occidentalis* SOBRE O CONTROLE DA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

STUDY OS THE EFFECT OF THE DRUG DINAMIZED *Thuja occidentalis* OVER THE CONTROL OF CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION

MARIANA CAMARGO HANDA¹, MONICA BORDIN PESSUTO², GISELY CRISTINY LOPES^{3*}

1. Acadêmica do curso de graduação em Farmácia da Faculdade Ingá – UNINGÁ; 2. Mestre em Ciências Farmacêuticas, Co-orientadora do Trabalho de Conclusão de Curso do Bacharelado em Farmácia da Faculdade Ingá – UNINGÁ; 3. Doutora em Ciências Farmacêuticas, Orientadora do Trabalho de Conclusão de Curso do Bacharelado em Farmácia da Faculdade Ingá – UNINGÁ.

* Rodovia PR 317, 6114, Maringá, Paraná, Brasil, CEP: 87035-510. giselycl@gmail.com

Recebido em 01/10/2014. Aceito para publicação em 04/11/2014

RESUMO

O processo de morte celular programada ou apoptose vem sendo muito estudado devido ao seu importante papel na regulação e manutenção dos organismos multicelulares. *Aspergillus* é um grupo de fungos filamentosos que abrangem mais de 200 milhões de anos de evolução. Os fungos filamentosos revelam-se úteis como modelo eucarionte para o estudo da apoptose, onde as relações filogenéticas mostram similaridade de mamíferos com as proteínas apoptóticas de espécies de *Aspergillus*. *Thuja occidentalis* é uma planta utilizada em homeopatia e, apresenta efeitos promissores contra papilomas e condilomas. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do medicamento homeopático *Thuja occidentalis* 30CH sob a germinação e desenvolvimento vegetativo do ascomiceto de *Aspergillus nidulans*, e sua relação com a indução de apoptose em condições normais e, em presença de danos genéticos causados pela exposição à radiação ultravioleta. Na avaliação *in vitro*, o medicamento homeopático *Thuja occidentalis* CH30, provocou reparo e apoptose no modelo de diferenciação celular utilizado, com aumento na atividade de ativação metabólica, ativação de ciclo celular e ativação do crescimento polarizado durante a germinação de *Aspergillus nidulans*, demonstrando efeito pró- homeostase que fundamenta o uso dessa preparação como coadjuvante no tratamento de tumores.

PALAVRAS-CHAVE: *Thuja occidentalis*, *Aspergillus nidulans*, homeopatia, apoptose.

ABSTRACT

The process of programmed cell death or apoptosis has been extensively studied due to its important role in the regulation and maintenance of multicellular organisms. *Aspergillus* is a group of filamentous fungi spanning over 200 million years of evolution. Filamentous fungi are eukaryotic excellent models for the study of apoptosis, where the phylogenetic relationships show similarity with mammalian apoptotic proteins in *Asper-*

gillus species. *Thuja occidentalis* is a plant used in homeopathy, and shows promising effects against papillomas and condylomas. The objective of this work was evaluate the effect of the homeopathic medicine *Thuja occidentalis* 30CH under germination and vegetative growth of the ascomycete *Aspergillus nidulans*, and its relation to the induction of apoptosis in normal conditions and in the presence of genetic damage caused by exposure to ultraviolet. *In vitro* evaluation, the homeopathic remedy *Thuja occidentalis* CH30 has caused repair and apoptosis in cell differentiation model used, with increase in the activity of metabolic activation, activation of cell cycle and activation of polarized growth during germination of *A. nidulans*, demonstrating pro homeostasis effect that justifies the use of this preparation as coadjuvant in the treatment of tumors.

KEYWORDS: *Thuja occidentalis*, *Aspergillus nidulans*, homeopaty, apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

A homeopatia é uma terapia fundada pelo médico Christian Frederich Samuel Hahnemann no século XVIII e, baseia-se em alguns princípios não convencionais, tais como: ultradiluições homeopáticas, doses mínimas, princípio da similitude, experimentações em indivíduos sadios e medicamento único¹.

No Brasil, os primórdios da Homeopatia remontam a meados de 1840, sendo inicialmente utilizada por escravos e pelas classes menos favorecidas, em virtude de seu baixo custo, associados à eficácia e segurança. Foi reconhecida como especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina em 1980, com reconhecimento reafirmado em 2002, por meio da Resolução CFM nº 1634/2002².

Segundo Dr. Hahnemann, o princípio da similitude é o mais importante e definidor conceito da homeopatia, e baseia-se no “*Similia similibus curantur*” (semelhante

cura semelhante), o qual foi enunciado por Hipócrates no século IV a.C.¹.

A ciência homeopática busca estimular a cura ou melhora de determinada doença ou disfunção orgânica através de preparados de princípios ativos em doses baixas, empregando técnicas precisas de diluição e succussão, que resultam em medicamentos dinamizados, ou seja, nas ultradiluições homeopáticas³.

Na ciência moderna, cada vez mais a procura por novas terapias, além dos tratamentos alopáticos convencionais vem sendo avaliadas, entre elas, a homeopatia. Essa terapia visa minimizar a toxicidade, reduzir custos e propiciar o uso de princípios ativos e matérias-primas abundantes e/ou de fácil acesso. Assim, vários estudos vêm sendo realizados com preparados homeopáticos em várias áreas da ciência na busca de novas descobertas e avanços científicos⁴⁻⁶.

Thuya occidentalis é uma planta utilizada na homeopatia e, apresenta efeitos promissores contra certos tipos de tumores⁷, principalmente sobre papilomas e condilomas⁸. Segundo Sunila *et al.* 2009⁹, medicamentos dinamizados podem agir como indutores de apoptose e/ou apresentar citotoxicidade para células tumorais. Estudos recentes com o medicamento homeopático *Carcinosinum* 30CH e 200C, sugerem esta ação, pois o mesmo induziu genes pró-apoptóticos em cultura de células tumorais *in vitro*⁹.

O processo de morte celular programada ou apoptose vem sendo muito estudado devido ao seu importante papel na regulação e manutenção dos organismos multicelulares¹⁰.

Aspergillus é um grupo de fungos filamentosos que abrangem mais de 200 milhões de anos de evolução. Os fungos filamentosos revelam-se úteis como modelo eucariote para o estudo da apoptose, pois as relações filogenéticas mostram similaridade de mamíferos com as proteínas apoptóticas de *Aspergillus*¹¹.

Aspergillus (=Emericella) nidulans é um fungo filamentosos, com taxa de crescimento rápida, sendo considerado modelo para estudos de genética do desenvolvimento, portanto, um excelente sistema para o estudo da diferenciação celular¹². Sua utilização é indicada devido a haploidia, morfogênese bem definida e ciclo de vida curto, compreendendo 3 fases: o ciclo vegetativo, que inicia com a germinação do esporo (conídio ou ascósporo) e continua por toda vida da colônia, no crescimento e ramificação das hifas; o ciclo assexual ou conidiogênese, inicia-se nas hifas que diferenciam-se em conidióforos, e pelo processo de mitose originam os conídios e, o ciclo sexual ou ascospogênese, fase em que formam-se os esporos a partir do processo de meiose, ditos ascósporos. Apesar da influência de fatores ambientais, estas fases são expressas por grupos de genes que estabelecem relação entre as diferentes cascatas regulatórias de cada fase¹³. Esse o motivo que nos leva a utilizar este modelo

na avaliação da ação de substâncias inibidoras ou protetoras sobre os mecanismos de controle da expressão gênica e preservação da homeostase.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do medicamento dinamizado *Thuya occidentalis* 30CH (Centesimal Hahnemanniana) sob a germinação e desenvolvimento vegetativo do ascomiceto de *A. nidulans*, e sua relação com a indução de apoptose em condições normais e, em presença de danos genéticos causados pela exposição à luz ultravioleta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem

Foi utilizada a linhagem *biA1methG1* de *Aspergillus nidulans*, proveniente da Universidade de Glasgow (Escócia), que apresenta desenvolvimento normal, esporos verdes e deficiência nutricional para biotina (vitamina) e metionina (aminoácido).

Análise de germinação de conídios em resposta a temperatura, estabilizador osmótico e fatores nutricionais

Para a análise da temperatura, foram feitos ensaios a 28° C e 37° C. Para a avaliação do efeito do estabilizador osmótico foram utilizados meios com 0,5 M de NaCl. Para se estimar a influência dos fatores nutricionais, foi utilizado, o meio completo e o meio mínimo, suplementado com os nutrientes específicos para cada linhagem.

Para a análise de germinação, conídios das linhagens em estudo foram coletados de colônias com 5 dias de crescimento em meio completo, a 37° C e transferidos para 0,01% de Tween 80. As suspensões de conídios foram filtradas em lâ de vidro e inoculadas nos diferentes meios líquidos. Em seguida, 100 uL foram transferidos para lâminas de microscopia em câmara úmida e incubados nas duas temperaturas por um período de 8 horas. A cada 2 horas, as duas lâminas (repetições) de cada condição foram analisadas ao microscópio óptico.

Em cada leitura foram analisados 200 conídios e calculadas as porcentagens de conídios em cada uma das fases de germinação (conídio dormente, embebido, com botão germinativo e com tubo germinativo).

Na última leitura, foi feita uma estimativa de sobrevivência, considerando-se vivos apenas os conídios com tubo germinativo e observação de tipo e frequência de aberrações no desenvolvimento dos tubos germinativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, o medicamento *Thuya occidentalis* foi preparado segundo a Farmacopeia Homeopática Brasileira, 3ª edição, na potência 30CH, ou seja, na trigésima dinamização Centesimal Hahnemanniana, considerada uma ultradiluição.

A ultradiluição (UHD) é obtida a partir da diluição de uma solução acima do número de Avogadro, alcançada através da técnica de dinamização (diluição com sucusão). O medicamento homeopático obtido através da ultradiluição induz um efeito celular supressor e estimulador que age sobre sistemas orgânicos; apresenta curvas dose-efeito oscilatórias, mas eficiente o bastante, para a manutenção da homeostasia celular³.

Segundo Morais¹⁴, o efeito biológico observado com as ultradiluições advém de uma reação secundária do organismo à substância farmacológica utilizada, decorrente de uma alteração da molécula de água, num esforço finalístico de manutenção da homeostase.

Os resultados da análise de germinação estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Porcentagem de conídios da linhagem *biAlmethG1* em cada fase de germinação em 3, 4, 6, 8 horas; (C) grupo controle; (T) grupo tratado com *Thuya occidentalis* 30CH.

	3 horas		4 horas		6 horas		8 horas	
	(C)	(T)	(C)	(T)	(C)	(T)	(C)	(T)
DORMENTE	50,9	48,6	22,7	8,2	1,7	0	0	0
EMBEBIDO	49,1	49,1	33,6	25,5	6,6	2,5	0,5	2
BOTÃO	0	0	34,6	22,6	11,6	5,4	0,5	1,5
GERMINADO	0	0	9	43,8	70,9	80,9	94,7	90
MALFORMADO	0	0	0	0	9,6	11,2	4,4	6,5

Como se pode observar na tabela 1, após 2 horas, quando ocorre o início da ativação metabólica, não houve ativação ou inibição da germinação em resposta ao tratamento.

No período seguinte, 3 horas, nenhum aumento na ativação metabólica foi constatado. No entanto, houve ativação do metabolismo e do ciclo celular com 4 horas de germinação, ocorrendo uma sensível ativação em resposta ao medicamento quando comparado com o controle.

A ativação metabólica tardia foi significativa. Podemos observar, através do ensaio, a ativação do crescimento polarizado, em que ocorre a primeira mitose, que resultou em um grande número de germinados, 43% da *Thuya occidentalis* 30CH contra 9% do controle.

Após 6 horas, o grupo controle apresentou 0,5% de mortos e 9,5% de germinados, contra o 2% e 98% respectivamente no grupo tratado com *Thuya occidentalis* 30CH.

Com 8 horas, quando administrado sozinho, o medicamento homeopático *Thuya occidentalis* 30CH apresentou maior número de mal formados que o controle, o que indica provável reparo, com apoptose, o seja, o grupo tratado apresenta sinais pró-apoptóticos significativos.

O reparo de DNA está ligado com a regulação, transcrição e replicação do ciclo celular¹⁵, e é um mecanismo importante da célula reparar seus danos e/ou perdas.

De acordo com a literatura, *T. occidentalis* foi avaliada em experimentos *in vitro* e *in vivo*, e revelou significativo potencial imunofarmacológico^{2,8}. Naser et al.¹⁶, em seu trabalho de revisão, sugerem que os ativos fitoquímicos presentes em extratos de *T. occidentalis* apresentaram ação estimulante em citocinas e, modulam a produção de anticorpos, além de atuarem na ativação de macrófagos e outras células imunocompetentes.

A observação das características de cada fase de germinação de *A. nidulans* permite-nos inferir se o tratamento da amostra com o medicamento *Thuya occidentalis* 30CH, quando comparado ao controle, revela ou não interferência nas fases de ativação metabólica e síntese proteica (dormente-embebido) e no ciclo celular (embebido-botão).

Na Tabela 2 observa-se que, nas amostras de *A. nidulans* tratadas com *Thuya occidentalis* 30CH submetido à radiação com luz UV, houve diminuição do número de mal formados e significativo aumento de conídios mortos, comparados ao grupo controle, indicando, portanto, apoptose.

De acordo com Hiwasa et al.¹⁷, a radiação UV causa danos ao DNA e induz à apoptose. No trabalho, foi possível observar que na análise entre o controle irradiada com UV, e a amostra irradiada com UV e, tratada com *Thuya occidentalis* 30CH, o medicamento dinamizado intensificou a fase de ativação metabólica.

Tabela 2. Porcentagem de conídios da linhagem *biAlmethG1* em cada fase de germinação em 2, 4, 6, 8 horas; (C) grupo controle sem exposição à radiação ultravioleta; (T) grupo tratado com *Thuya occidentalis* 30 CH exposto a radiação ultravioleta; (UV) grupo irradiado com radiação ultravioleta.

	2 horas			4 horas			6 horas			8 horas		
	(C)	(UV)	(T)									
DORMENTE	30,2	61	59,1	11,5	36,3	35,3	5	14,6	9,8	2,9	8,6	8,8
EMBEBIDO	69,7	39	40,9	60	62,7	60,6	5	50,2	43,6	4,9	20,7	18,1
BOTÃO	0	0	0	16,5	0,9	4,1	4	18	15,7	0,9	9	12,5
GERMINADO	0	0	0	11,9	0	0	80	17,1	30,9	6	59,9	58,3
MALFORMADO	0	0	0	0	0	0	6	0	0	12,3	2	2,3

Com o uso de radiação ultravioleta (UV), houve o aumento da porcentagem de conídios mortos (dormentes + embebidos com 8 horas) (Figura 1), e a diminuição de mal formados, o que sugere que ocorreu apoptose.

O processo de morte celular programada ou apoptose é de extrema importância na homeostase tecidual e como meio de remoção de células com genomas instáveis¹⁰. Suas principais características morfológicas são: fragmentação do DNA, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos^{10,15}.

A apoptose pode ser desencadeada por diferentes fatores como ligações de moléculas e receptores de membrana, radiação, danos no DNA, agentes quimioterápicos, choque térmico, fatores de crescimento alterados, quantidade de nutrientes baixa, outros¹⁸.

O processo apoptótico é desencadeado por comple-

xas vias de sinalização, conhecidas como via intrínseca e via extrínseca, envolvendo a expressão de genes determinantes na síntese de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas^{19,20}.

Assim, o medicamento homeopático *Thuya occidentalis* 30CH revela sinais pró-apoptótico.

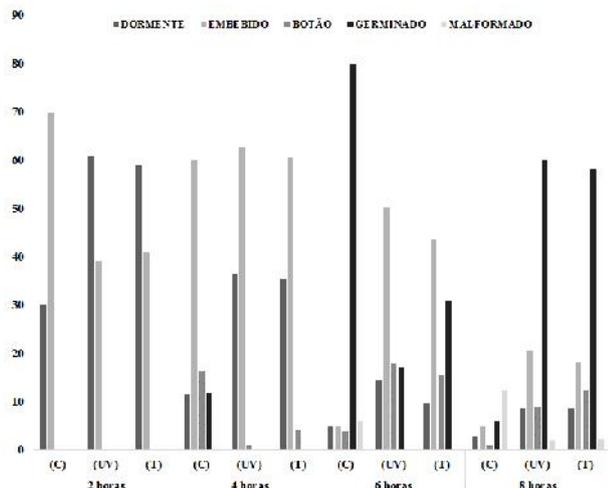


Figura 1. Gráfico comparativo para os valores em % de conídios da linhagem *biA1methG1* em cada fase de germinação em 2, 4, 6, 8 horas; (C) grupo controle sem exposição à radiação ultravioleta; (T) grupo tratado com *Thuya occidentalis* 30CH exposto a radiação ultravioleta; (UV) grupo irradiado com radiação ultravioleta.

4. CONCLUSÃO

Em condições normais, o medicamento homeopático *Thuya occidentalis* 30CH provocou aumento na atividade da ativação metabólica, ativação de ciclo celular e ativação do crescimento polarizado durante a germinação de *Aspergillus nidulans*.

Nas amostras do fungo irradiadas com luz ultravioleta, o tratamento com *Thuya occidentalis* CH30 promoveu a apoptose. Evidencia-se assim efeito pró-homeostase que fundamenta o uso dessa preparação como coadjuvante no tratamento de tumores.

Conflito de interesse

Os autores afirmam que não tem qualquer conflito de interesse com o tema abordado no artigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Profa. Dra. Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da Rocha, do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, pela colaboração na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- [01] Dayenas E, Beauvais F, Amara J, Oberbaum M, Robinson B, Miadonna A, Tedeschit A, Pomeranz B, Fortner P, Belon P, Saintelaudy J, Poitevin B, Benveniste J. Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE. *Nature* 1988; 333:816-8.
- [02] Conselho Federal de Medicina, 2002. Resolução CFM nº 1634/2002, Dispõe sobre convênio de reconhecimento de especialidades médicas firmado entre o Conselho Federal de Medicina CFM, a Associação Médica Brasileira – AMB e a Comissão Nacional de Residência Médica – CNRM.
- [03] Guedes JRP. Ultradiluição homeopática de triiodotironina altera a apoptose celular da cauda de girinos de *Rana catesbeiana*: *in vitro*. São Paulo, 2009. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 60p.
- [04] Monteiro VLC, Coelho MCOC. *Thuya occidentalis* e papilomatose. *Brazilian Homeopathic Journal* 2008; 10:16-21.
- [05] Santos FR, Santana RO, Carvalho EA, Costa NA, Minafra CS, Oliveira PR. Desempenho e perfil sérico bioquímico de frangos de corte alimentados com rações contendo produtos homeopáticos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 2014; 15(2):394-405.
- [06] Andrade FMC, Casali VWD, Cecon PRC. Crescimento e produção de cumarina em plantas de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.) tratadas com isoterápico. *Rev Bras. Plantas Med.* 2012; 14:154-8.
- [07] Hayfield R. *Vida Nova: Homeopatia. Remédios simples para uma saúde natural.* Lisboa: Editora Estampa Ltda, 1999; 307.
- [08] Valsa JO, Felzenszwalb I. Genotoxic evaluation of the effect of *Thuya occidentalis* tinctures. *Rev. Bras. Biol.* 2001; 61(2):329-32.
- [09] Sunila ES, Kuttan R, Preethi KC, Kuttan G. Dynamized preparations in cell culture. *Evid Based Comp Altern Med.* 2009; 6:257-63.
- [10] Anazetti MC, Melo PS, Durán N, Haun M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology* 2003; 188(2-3):261-74.
- [11] Robson GD. Programmed cell death in the aspergilli and other filamentous fungi. *Medical Mycology* 2006; 44:109-14.
- [12] Reis MF, Rocha CLMSC. Análise citológica do efeito dos extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre os ciclos de desenvolvimento de *Aspergillus (=mericella) nidulans*. *SaBios: Rev Saúde e Biol* 2014; 9(1):100-107.
- [13] Timberlake WE, Clutterbuck AJ. Genetic regulation of conidiation. *Prog Ind Microbiol.* 1994; 29: 383-427.
- [14] Moraes J. *O Poder das Bolinhas.* Revista Superinteressante São Paulo: Editora Abril. 2002; 172.
- [15] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26:239-57.
- [16] 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; 2(1):69–78.
- [17] Hiwasa T, Arase Y, Chen Z, Kita K, Umezawa K, Ito H, Suzuki N. Stimulation of ultraviolet-induced apoptosis of human fibroblast UVr-1 cells by tyrosine kinase inhibitors. FEBS Letters 1999; 444:173-6.
- [18] Stevens JB, Liu G, Bremer SW, Ye KJ, Xu W, Xu J, Sun Y, Wu GS, Savasan S, Krawetz SA, Ye CJ, Heng HH. Mitotic cell death by chromosome fragmentation. Cancer Res. 2007; 67(16):7686-94.
- [19] Mendes GPA. Apoptose: Programa Molecular de Morte Celular. Einstein 2003; 1:15-18
- [20] Mandal SK, Biswas R, Bhattacharyya SS, Paul S, Dutta S, Pathak S, Khuda-Bukhsh AR. Lycopodine from *Lycopodium clavatum* extract inhibits proliferation of HeLa cells through induction of apoptosis via caspase-3 activation. Eur J Pharmacol. 2010.

