

**UNIVERSIDADE PAULISTA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E  
EXPERIMENTAL**

**ESTUDO DOS EFEITOS *IN VIVO* DE PREPARAÇÕES  
HOMEOPÁTICAS DE *Viscum album* NO  
MODELO DE MELANOMA MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental

**THAÍS CRISTINA DA SILVA**

**SÃO PAULO  
2023**

**UNIVERSIDADE PAULISTA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E  
EXPERIMENTAL**

**ESTUDO DOS EFEITOS *IN VIVO* DE PREPARAÇÕES  
HOMEOPÁTICAS DE *Viscum album* NO  
MODELO DE MELANOMA MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Cristina Perez Hurtado e coorientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leoni Villano Bonamin.

**THAÍS CRISTINA DA SILVA**

**SÃO PAULO  
2023**

Silva, Thaís Cristina da.  
Estudo dos efeitos *in vivo* de preparações homeopáticas de *Viscum album* no modelo de melanoma murino / Thaís Cristina da Silva. - 2023.

68 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leoni Villano Bonamin.

1. Câncer. 2. Melanoma. 3. Homeopatia. 4. *Viscum album*.  
5. *Quercus robur*. 6. *Abies alba*. 7. Terapias integrativas.  
I. Hurtado, Elizabeth Cristina Perez (orientadora). II. Bonamin, Leoni Villano (coorientadora). III. Título.

**THAÍS CRISTINA DA SILVA**

**ESTUDO DOS EFEITOS *IN VIVO* DE PREPARAÇÕES  
HOMEOPÁTICAS DE *Viscum album* NO  
MODELO DE MELANOMA MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Cristina Perez Hurtado  
UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leoni Villano Bonamin  
UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Barbosa Suffredini  
UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Holandino Quaresma  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amarilys de Toledo César  
HN CRISTIANO – LABORATÓRIO HOMEOPÁTICO

CONCEITO FINAL: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à minha mãe, pois além de realizar o trabalho mais árduo do mundo que é gerar uma vida, ela sempre cuidou, zelou, amou e lutou por mim. Reconheço todo seu esforço e todas as oportunidades que me proporcionou. Se hoje tenho forças para lutar todos os dias pelos meus sonhos, saiba que foi com você que aprendi a correr atrás. Sempre dedicada, trabalhadora, foi capaz de cuidar de uma família toda sozinha, fazendo o papel de mãe e de pai. Agradeço todos os dias por ter o privilégio de ser sua filha. Tenho orgulho e amor infinito por você.

Ao meu “*paidrasto*”, por todo carinho, amor e cuidado nestes quase 20 anos de convívio. A vida me deu a chance de poder escolher a quem chamar de pai, um homem honesto, sincero, do bem, brincalhão e excelente cozinheiro!!! Obrigada por ter sempre me apoiado, acreditado que sou capaz de tudo e cuidar tanto da minha mãe. Amo você.

A meu noivo, Jorge, que há quase quatorze anos caminha lado a lado comigo e vem acompanhando as minhas vitórias. Obrigada pela paciência, amor, compreensão, apoio e por me fazer feliz, dividindo experiências maravilhosas. Obrigada por entender minha ausência em alguns momentos. Te amo.

A minha irmã, que mesmo nove anos mais velha, por vezes, parece mais nova. Saiba que, todas as vezes que brigo com você, é sempre no intuito de fazê-la enxergar quanto a vida tem a oferecer e o quão longe você pode chegar. Desejo a você tudo o que sonho para mim. Obrigada por me dar o maior presente do mundo, o Davi. Por ele, lutarei ainda mais, para que possa sonhar, crescer e realizar tudo o que ele quiser. Amo vocês.

A minha avó, Alice (*in memoriam*), quem sempre cuidou de mim com tanto amor e carinho, enquanto minha mãe trabalhava fora. Às vezes, sinto que faltaram palavras para expressar meu amor e gratidão a você, mas sei que, de onde estiver, pode me ver e escutar tudo o que faltou ser dito. Sinto sua presença me dando forças todos os dias. Obrigada por tanto!

A meu sogro e a minha sogra, que sempre me trataram como uma filha, incentivando-me em todos os momentos, demonstrando interesse por tudo o que faço. Além de criarem um filho incrível para dividir a vida comigo, apoiam e auxiliam em todas as nossas decisões. Vocês são pais incríveis para o Jorge e para mim. Não

tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram e fazem por nós. Amo vocês.  
Gratidão por toda vida!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e amparar-me em todos os momentos, fazendo com que a palavra desistir não esteja presente em meu vocabulário.

Em especial, agradeço à minha querida orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Cristina Perez Hurtado, por me acolher, entender todas as dificuldades que enfrentei e, ainda assim, não desistir de mim. Obrigada por sua confiança, carinho, paciência, agitação e por todos os lanchinhos que levou a mim e todos os seus orientandos nas infinitas manhãs, tardes e noites de experimentos. Você é espetacular! Gratidão por tudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leoni Villano Bonamin, sempre disposta a ajudar, ouvir, ficar horas e horas me ensinando e analisando lâminas e mais lâminas. A Sra. foi um presente em minha vida no mestrado e abriu as portas para o meu doutorado. Sem o seu apoio, seu carinho, sua paciência, sua voz que acalma o coração aflito, eu não estaria aqui hoje. A Sra. transforma todas as pessoas em seres humanos mais leves, serenos e mostra que a vida, é muito mais simples do que parece. Tenho muito carinho, respeito e gratidão por tudo o que a Sra. fez por mim. Muito obrigada!

Agradeço a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Holandino pela parceria e disposição em sempre auxiliar a mim e aos demais colegas, desde o envio do *viscum* até as dúvidas que foram surgindo no decorrer dos experimentos. Muito obrigada pelo incentivo e carinho com todos.

Agradeço também a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Amarilys Cesar e a Farmácia HN Cristiano pelo preparo, envio dos medicamentos e por sempre contribuir com todas as pesquisas da pós. O apoio de vocês é fundamental para que novas pesquisas continuem sendo realizadas. Gratidão!

À Vice-Reitoria de Pós-Graduação da UNIP, pela bolsa concedida e por sempre incentivar novas pesquisas.

Aos técnicos de laboratório que sempre me receberam com sorriso no rosto e estiveram dispostos à auxiliar em tudo, até mesmo em dias de loucura total, fazendo hora extra, mas sempre com carinho e com muita vontade de ajudar a ver esse sonho se tornar realidade. Joyce, Suzana, Wilton, Cleide, Paulo e Michele, muito obrigada por tudo!

Aos amigos que a vida me trouxe por intermédio da UNIP, Sandra A. G. Pinto, Thiago A. Viração, Débora O. M. Silvestro, Vanessa Xavier e Priscila do Prado.

Obrigada por disponibilizarem o tempo e compartilharem o conhecimento de cada um de vocês comigo. Todos foram fundamentais para a realização deste trabalho. Tive a sorte de encontrar pessoas tão generosas e queridas como vocês. Obrigada!

Às minhas chefas, coordenadoras Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tais Fortes e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Pardo, por incentivarem o meu crescimento profissional e sempre estarem dispostas a me ajudar. Obrigada por me entenderem e pelo apoio incondicional. Minha eterna gratidão.

As amigas, estas que me auxiliaram em tantos momentos, que me deram forças e me fizeram continuar. Agradeço à Thalita Serrano, Karina Nascimento, professoras Eloise Vieira, Rachel Franklin, Débora Popov, Fabiane Marui, Josiane Piccolo e Sonia Couto. Obrigada, de coração.

A todos que, de forma direta ou indireta, ajudaram a construir esse trabalho, muito obrigada pelo carinho e compreensão.

*“Quanto mais palpável é uma verdade, mais tempo requer para conquistar o lugar a que tem direito. Os obstáculos que se colocam em seu caminho, se devem a que, essa verdade desencadeia a seu redor um verdadeiro ódio. Pois, ela anuncia uma revolução, uma perturbação dos interesses existentes e dos lugares conquistados”.*

Samuel Hahnemann

## RESUMO

Nos últimos anos diversos autores têm mostrado os benefícios da homeopatia na melhora da qualidade de vida e sobrevida de pacientes com câncer. Dados preliminares do grupo mostraram em ensaios *in vitro*, que o tratamento de células de melanoma murino B16F10 com ultradiluições de *Viscum album* (Va) obtido da árvore hospedeira *Quercus robur* durante o verão da Suíça (Qr), nas escalas de 12DH, 200CH e 5LM mostraram diminuição tanto na viabilidade dessas células, como na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da citocina MCP-1 quando comparadas as células tratadas com o quimioterápico carboplatina. Entretanto, os efeitos *in vivo* do tratamento com diferentes escalas homeopáticas e tinturas mães de Va no modelo de melanoma murino não foram ainda esclarecidos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com tinturas mãe (TM) de Va obtidos das árvores hospedeiras *Abies alba* e *Quercus robur* no verão da Suíça e diferentes escalas homeopáticas de Va obtido da árvore hospedeira *Quercus robur* durante o verão da Suíça em relação à sobrevida e manifestações clínicas em camundongos com melanoma. Para isto, camundongos C57BL/6 foram inoculados com células B16F10 e, após aparecimento do nódulo tumoral (aproximadamente 6 dias), foram tratados três vezes por semana com água, álcool 10%, carboplatina, tinturas mães (TM) de Va coletadas de *Quercus robur* (VaQr) ou *Abies alba* (VaAa) ou preparações ultradiluídas de VaQr nas potências de 12DH, 200CH ou 5LM, até aproximadamente 30 dias. Análises histopatológicas do tumor, baço, fígado e pulmão foram realizadas em conjunto com a quantificação de citocinas no lisado tumoral e no soro, em animais eutanasiados 14 dias após surgimento da massa tumoral. Avaliações do estado geral dos animais e do crescimento tumoral foram realizadas em dias alternados até aproximadamente 30 dias após inoculação das células tumorais. Os resultados obtidos sugerem que os tratamentos com VaQr na 12DH e 5LM promovem aumento da sobrevida e do peso corporal, bem como uma tendência ao aumento da qualidade de vida dos animais com melanoma, visto que estes apresentaram menores manifestações clínicas quando comparados aos demais grupos de tratamento, principalmente o grupo carboplatina. Em conjunto, os dados aqui apresentados são inéditos e de alta relevância para o esclarecimento dos efeitos de Va ultradiluído no tratamento de melanoma, além de fornecer suporte a abrir novas perspectivas para estudos futuros com Va ultradiluído, principalmente na potência 5LM, como promissora terapia complementar para tumores agressivos.

**Palavras-chave:** Câncer de pele, células B16F10, homeopatia, *viscum album*, *Quercus robur*, *Abies alba* e terapias integrativas.

## ABSTRACT

In recent years, several authors have shown the benefits of homeopathy in improving the quality of life and survival of cancer patients. Preliminary data from the group showed in vitro assays that the treatment of B16F10 murine melanoma cells with ultradilutions of *Viscum album* (Va) obtained from the host tree *Quercus robur* during the Swiss summer (Qr), in the scales of 12DH, 200CH and 5LM showed a decrease both in the viability of these cells and in the production of reactive oxygen species (ROS) and the cytokine MCP-1 when compared to cells treated with the chemotherapy drug carboplatin. However, the in vivo effects of treatment with different homeopathic scales and Va mother tinctures in the murine melanoma model have yet to be clarified. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of treatment with mother tinctures (TM) of Va obtained from the host tree *Abies alba* and *Quercus robur* in the summer of Switzerland and different homeopathic scales of Va obtained from the host tree *Quercus robur* during the summer of Switzerland regarding survival and clinical manifestations in mice with melanoma. For this, C57BL/6 mice were inoculated with B16F10 cells and, after the appearance of the tumor nodule (approximately 6 days), they were treated three times a week with water, 10% alcohol, carboplatin, mother tinctures (TM) of Va collected from *Quercus robur* (VaQr) or *Abies alba* (VaAa) or ultradiluted preparations of VaQr in the strengths of 12DH, 200CH or 5LM, up to approximately 30 days. Histopathological analyzes of the tumor, spleen, liver and lung were performed together with the quantification of cytokines in the tumor lysate and serum, in euthanized animals 14 days after the appearance of the tumor mass. Evaluations of the animals' general condition and tumor growth were performed on alternate days until approximately 30 days after tumor cell inoculation. The results obtained suggest that treatments with VaQr at 12DH and 5LM promote increased survival and body weight, as well as a tendency to increase the quality of life of animals with melanoma, since these presented less clinical manifestations when compared to the other groups of animals. treatment, mainly the carboplatin group. Together, the data presented here are unprecedented and highly relevant for clarifying the effects of ultradiluted Va in the treatment of melanoma, in addition to providing support and opening new perspectives for future studies with ultradiluted Va, mainly at 5LM potency, as a promising complementary therapy. for aggressive tumors.

**Keywords:** Skin cancer, B16F10 cells, homeopathy, *viscum album*, *Quercus robur*, *Abies alba* and integrative therapies.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Escore facial de dor em ratos.....	<b>32</b>
<b>Figura 2: A, B, C, D, E, F e G:</b> Perfil de citocinas no soro de camundongos com melanoma após tratamento com ultradiluições de <i>Viscum album</i> em diferentes potencias homeopáticas.....	<b>41</b>
<b>Figura 3 A, B, C, D, E, F e G:</b> Perfil de citocinas no microambiente tumoral de camundongos com melanoma após tratamento com ultradiluições de <i>Viscum album</i> em diferentes potencias homeopáticas.....	<b>42</b>
<b>Figura 4 A, B, C, D, E, F e G:</b> Análise estatística determinada após histopatológico referente a necrose tumoral (A), congestão tumoral (B), hemorragia tumoral (C), derrame pigmentar tumoral (D), hiperplasia de polpa branca (E), congestão hepática (F) e atelectasia e enfisema pulmonar (G).....	<b>46</b>
<b>Figura 5:</b> Análise de componentes principais feita com dados histopatológicos de animais inoculados com melanoma e tratados com Tinturas mães ou ultradiluições de <i>Viscum album</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 6:</b> Análise de correspondência canônica feita com dados histopatológicos de animais inoculados com melanoma e tratados com Tinturas mães ou ultradiluições de <i>Viscum album</i> mostrando as variáveis climáticas (interleucinas).....	<b>48</b>
<b>Figura 7 A, B, C e D:</b> Efeitos dos tratamentos de <i>Viscum album</i> em relação ao crescimento tumoral (A), peso tumoral (B), peso $\Delta$ corporal (C) e na sobrevivência (D) de animais com melanoma.....	<b>51</b>
<b>Figura 8:</b> Efeito do tratamento com ultradiluições de <i>Viscum album</i> em relação as manifestações clínicas apresentadas em animais com melanoma.....	<b>54</b>
<b>Figura 9:</b> Análise de componentes principais feita com dados das manifestações clínicas de animais inoculados com melanoma e tratados com Tinturas mães ou ultradiluições de <i>Viscum album</i> .....	<b>55</b>

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1:</b> Representação dos scores atribuídos nas análises histopatológicas e descrição das características encontradas nas avaliações.....	<b>34</b>
<b>Quadro 1:</b> Resultados mais relevantes obtidos em todas as análises, com os tratamentos utilizados na Fase I .....	<b>63</b>
<b>Quadro 2:</b> Resultados mais relevantes obtidos em todas as análises, com os tratamentos utilizados na Fase II.....	<b>63</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C: Antes de Cristo  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
°C: graus Celsius  
CBA: *Cytometric beads array*  
CH: Escala centesimal Hahnemanniana  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
DH: Escala decimal Hahnemanniana  
EROS: Produção de espécies reativas de oxigênio  
g: Grama  
HE: Hematoxilina-eosina  
INCA: Instituto Nacional do Câncer  
i.p: Intraperitoneal  
IFN-  $\gamma$ : Interferon gama  
IL-2: Interleucina 2  
IL-4: Interleucina 4  
IL-6: Interleucina 6  
IL-10: Interleucina 10  
IL-17: Interleucina 17  
Kg: Quilograma  
LM: Escala cinquenta milésimal  
MCP1: Proteína quimiotática de monócitos-1  
mg: Miligrama  
 $\mu$ g: Micrograma  
mL: Mililitro  
 $\mu$ L: Microlitro  
 $\mu$ m: Micrômetro  
mM: Milimolar  
mm<sup>3</sup>: Milímetros cúbicos  
nm: Nanômetro  
PE: Fluorocromo phycoerythrin  
PBS: Phosphate buffered saline (Tampão de fosfato salino)  
Pg: Picograma

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

s.c: Subcutâneo

SFB: Soro fetal bovino

SPF: *Specific pathogen-free*

TGF- $\beta$ : Fator transformador de crescimento- $\beta$

TM: Tintura mãe

TMs: Tinturas mães

TM Aa: Tintura mãe de *Abies alba* de verão

TM Qr: Tintura mãe de *Quercus robur* de verão

TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

UV: Radiação ultravioleta

Va: *Viscum album*

## SUMÁRIO

<b>I. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>22</b>
<b>II. ARTIGO - Periódico para submissão: Research In Veterinary Science .....</b>	<b>25</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
2.1 Cultura de células de melanoma murino B16F10.....	28
2.2 Preparo dos medicamentos .....	28
2.3 Animais .....	29
2.4 Desafio tumoral e tratamentos .....	30
2.5 Ensaio de <i>endpoint</i> .....	31
2.6 Volume tumoral e peso corporal.....	32
2.7 Análise histopatológica.....	33
2.8 Produção de lisado tumoral.....	38
2.9 Quantificação de citocinas por citometria de fluxo .....	38
2.10 Análise estatística .....	39
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 Perfil de citocinas no microambiente tumoral e no soro após tratamentos com ultradiluições de <i>Viscum album</i> .....	39
3.2 Análise histopatológica do tumor, baço, fígado e pulmão após tratamentos.....	43
3.2.1 Análises de necrose, congestão, hemorragia e derrame pigmentar intratumoral.....	43
3.2.2 Hiperplasia de polpa branca.....	44
3.2.3 Congestão no fígado .....	44
3.2.4 Atelectasia e enfisema pulmonar .....	44
3.3 Efeitos do tratamento com ultradiluições de <i>Viscum album</i> no desenvolvimento tumoral, peso corporal e sobrevida .....	49
3.4 Manifestações clínicas apresentadas após tratamento com ultradiluições de <i>Viscum album</i> .....	52

<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONFLITOS DE INTERESSE .....</b>	<b>64</b>
<b>7. DECLARAÇÃO DE ÉTICA .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>68</b>

## I. REVISÃO DA LITERATURA

O termo "melanoma" foi originalmente empregado em 1838 por Robert Carswell que o utilizou para descrever lesões malignas pigmentadas na pele, no entanto, a primeira descrição que se refere ao melanoma, surgiu durante o período 460 a 375 a.C. nas escrituras de Hipócrates (WAINSTEIN; BELFORT, 2004; INGRAFFEA, 2013). O melanoma forma-se a partir da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina responsáveis pela pigmentação e proteção da pele contra a radiação ultravioleta (UV). Estas células se originam embriologicamente da crista neural, sendo a pele seu principal sítio primário (INGRAFFEA, 2013).

Na veterinária, o melanoma tem sido descrito na maioria das espécies de animais domesticados, incluindo cães, gatos, cavalos, porcos e em animais silvestres terrestres e marinhos. Entretanto, cães são aqueles que apresentam maior incidência da neoplasia (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Um estudo com 2.350 casos de tumores melanocíticos em cães mostrou que 70% eram melanomas malignos e 30% eram tumores benignos. A localização diverge, contudo, a cavidade oral (62%) e a pele (27%) são os locais mais comuns, seguidos por região digital (6%), ungueal (4%) e ocular (1%) respectivamente (VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020). Como os cães vivem próximos aos humanos, eles são influenciados por fatores ambientais semelhantes que podem levar a doenças crônicas e câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Já os felinos apresentem menor incidência da neoplasia quando comparados aos cães, quando são diagnosticados, a localização mais comum é intraocular, sendo a íris a área mais afetada. Nesses casos a ocorrência de metástase é de 63% (VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020). Com frequência na veterinária, as neoplasias passam despercebidas pelos tutores e, quando é identificada a massa tecidual, geralmente se encontra progressiva, em estágio avançado. O diagnóstico é dado pela observação dos sinais clínicos e conclusivo através de exame histopatológico e biópsia (SARDÁ, 2018).

Em seres humanos, o câncer é considerado a segunda maior causa de morte entre crianças e adultos no mundo, sendo um importante problema de saúde pública, atrás apenas das doenças cardiovasculares (BRAY *et al.*, 2018).

Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*), estima-se que ocorrerão 18 milhões de novos casos de câncer no mundo e 9,6 milhões de óbitos (BRASIL, 2022).

No Brasil, para o triênio 2023-2025, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontou para cerca de 704 mil novos casos de câncer, aumento este de 79 mil novos casos quando comparado a estimativa do triênio 2020-2022. Destes 704 mil novos casos, 221 mil serão do câncer de pele não melanoma, que é o mais frequente na população mundial (BRASIL, 2020; BRASIL, 2022).

Embora o melanoma não figure entre os tipos de câncer mais incidentes, ele é o tipo de câncer de pele mais agressivo devido ao seu elevado potencial metastático e por ser resistente à maioria das terapias. Como em outros tipos de câncer, a presença da doença metastática no melanoma confere o pior prognóstico e o mais alto índice de mortalidade entre os cânceres de pele. Para o triênio 2020-2022, era esperado que o melanoma correspondesse a 4.200 novos casos em homens e 4.250 novos casos em mulheres (SHANNAN, 2016; BRASIL, 2020). Contudo, com a nova estimativa publicada para o triênio 2023-2025, estima-se que ocorrerão 8.980 novos casos, destes, 4.640 serão em homens e 4.340 em mulheres (BRASIL, 2022).

Ainda que o diagnóstico de melanoma normalmente traga medo e apreensão, quando realizado de forma precoce, melhora a sobrevida dos pacientes. A sobrevida média mundial estimada em 5 anos é de 69%, sendo de 73% nos países desenvolvidos e de 56% nos países em desenvolvimento, com diminuição da mortalidade geral de 70 a 80% após o diagnóstico precoce (GUIDETTI *et al.*, 2016).

No tratamento da doença metastática, a quimioterapia tem-se mostrado inefetiva no aumento da sobrevida global desses pacientes. Os quimioterápicos antineoplásicos mais comumente estudados (dacarbazina, temozolomida, nitrosureias, os análogos da platina e os agentes com ação nos microtúbulos) apresentam taxas de respostas semelhantes. Já os efeitos colaterais e a tolerância ao tratamento variam de acordo com o medicamento escolhido (BRASIL, 2014).

Embora os tratamentos convencionais englobem a quimioterapia, radioterapia e cirurgia, uma das alternativas que vem sendo empregadas para o tratamento de diversos tipos de câncer é a imunoterapia com o uso de anticorpos monoclonais (VIDAL *et al.*, 2018). Estudos mostraram que pacientes que utilizaram anticorpos monoclonais no tratamento do melanoma metastático como: ipilimumab (Yervoy®), antagonista do antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (anti-CTLA-4) e os anticorpos monoclonais pembrolizumab (Keytruda®) e nivolumab (Opdivo®), antagonistas do receptor da proteína de morte programada 1 (anti-PD1) mostraram melhora da sobrevida, entretanto, os medicamentos biológicos apresentam alto custo, o que limita

o acesso da população em geral a este tipo de tratamento (ACHKAR; TARHINI, 2017; VIDAL *et al.*, 2018).

Considerando que os efeitos colaterais dos medicamentos impactam negativamente na vida do indivíduo doente, além do alto custo, muitos pacientes com câncer têm procurado cada vez mais novas alternativas de tratamento (FRENKEL *et al.*, 2010; BAGOT *et al.*, 2021). Essa busca também vem crescendo por tutores de pets, visto que os pequenos animais fazem, cada dia mais, companhia e parte das famílias. Dessa forma, existe também uma preocupação com a qualidade de vida deles (ROCHA, 2019).

O emprego de terapêuticas não convencionais no tratamento de diversas doenças e transtornos da saúde vêm aumentando substancialmente nas últimas décadas. Estas terapias podem ser administradas de forma complementar ou integrada ao modelo biomédico vigente e, são utilizadas em todos os países e por todas as camadas das populações (TEIXEIRA, 2017).

Uma das terapias complementares comumente utilizada para o tratamento do câncer é a homeopatia, ciência nascida na Alemanha, no início do século XIX e desenvolvida pelo médico alemão Christian Frederich Samuel Hahnemann. Baseia-se no princípio da similitude, no qual medicamentos preparados a partir de substâncias capazes de causar determinados sintomas em um indivíduo sadio, quando administradas em indivíduos doentes, em doses altamente diluídas podem curar estes mesmos sintomas (MONTEIRO; IRIART, 2007; BONAMIN, 2016).

Conforme a farmacopeia homeopática, os medicamentos ultradiluídos são preparados seguindo três escalas: centesimal, decimal e cinquenta milesimal. A escala centesimal *Hahnemanniana* (CH) é preparada na proporção de 1/100, ou seja, uma parte do insumo ativo em 99 partes de insumo inerte ou veículo, seja ele água ou álcool, perfazendo um total de 100 partes. A escala decimal (DH) é preparada na proporção de 1/10, uma parte do insumo ativo em nove partes de insumo inerte, perfazendo um total de 10 partes. A escala cinquenta milesimal (LM) é preparada na proporção de 1/50.000, uma parte do insumo ativo em 49 mil partes de insumo inerte, perfazendo um total de 50.000 partes. Os medicamentos homeopáticos são manipulados de acordo com procedimentos de diluição, seguidos de succussão e/ou trituração (BRASIL, 2011).

No tratamento do câncer, preparações fermentadas do extrato de *Viscum album* (Va) vêm sendo utilizadas como terapia complementar há aproximadamente

100 anos, entretanto, o Va já era utilizado há séculos pela medicina popular como tratamento para epilepsia, infertilidade, indigestão, hipertensão, vertigem e asma (FELENDÁ *et al.*, 2019; PENALOZA *et al.*, 2020). O Va foi mencionado pela primeira vez em 1904 por Rudolf Steiner. É uma planta medicinal, considerada semiparasita cujo extrato pode ser obtido a partir de diversas árvores hospedeiras, tais como o pinheiro (*Pinus*), abeto (*Abies*), amendoeira (*Prunus dulcis*), espinheiro (*Crataegus*), freixo (*Fraxinus*), macieira (*Malus*), olmo (*Ulmus*), salgueiro (*Salix*), álamo (*Populus*) ou carvalho (*Quercus*). Em todos os casos, a planta introduz o haustório (prolongamento da raiz) no hospedeiro se perpetuando nesta condição (BONAMIN *et al.*, 2017; HOLANDINO *et al.*, 2018; HOLANDINO *et al.*, 2020; ALMEIDA *et al.*, 2023).

Os extratos de Va aquoso contêm diversos componentes: flavonoides, triterpenos, lectinas, polissacarídeos, aminoácidos, viscotoxinas e diversos alcalóides. Dentre os princípios ativos existentes nesta planta, as lectinas I, II, III são as mais investigadas, que junto com as viscotoxinas são apontadas como os principais agentes antitumorais presentes no extrato por induzir apoptose e necrose nas células-alvo (CARVALHO, 2015). As lectinas se unem a estruturas glicosadas da membrana, penetram na célula e atingem os ribossomos inibindo a síntese de proteínas e levando à morte da célula por apoptose. As viscotoxinas agem diretamente nas membranas celulares alterando a sua estrutura e provocando a morte celular por necrose (KALIKS, 2017). Já os extratos de Va etanólicos possuem flavonoides, ácidos fenólicos e terpenoides, dessa forma sendo considerado com grande potencial para aplicações biológicas, como antioxidante, antimicrobiano e hipolipidêmico (MELO, 2023).

O preparo destes extratos de Va segue rígidos padrões farmacotécnicos de acordo com conceitos antroposóficos, que levam em consideração a árvore hospedeira e a época do ano ideal para a colheita, assim como para o preparo homeopático das Tinturas Mães (TMs) de Va (CARVALHO, 2015; HOLANDINO *et al.*, 2018; FELENDÁ *et al.*, 2019; HOLANDINO *et al.*, 2020).

Dentre as principais espécies de hospedeiros de Va estão as árvores: *Malus domestica*, *Quercus sp.*, *Ulmus sp.*, *Pinus sylvestris* e *Abies alba*. Pesquisas com *Viscum* parasita de *Malus domestica*, *Quercus sp.* e *Abies alba* colhido no verão evidenciaram maior índice de viscotoxinas na sua composição química e maior mortalidade sobre culturas de células tumorais (HOLANDINO *et al.*, 2018; HOLANDINO *et al.*, 2020).

TMs preparadas a partir de amostras de Va coletadas no verão de 2016 e 2017 e, no inverno de 2018, em diferentes locais da Suíça, apresentaram maiores concentrações de viscotoxina nas coletas de verão de *Abies alba*, *Malus domestica* e *Quercus robur*, bem como maiores níveis de mortalidade celular foram atribuídos ao seu perfil fotoquímico e aos seus maiores teores de viscotoxina (HOLANDINO *et al.*, 2018; HOLANDINO *et al.*, 2020).

Adicionalmente, estudo *in vitro* analisou o perfil químico de tinturas mãe de Va, bem como seus efeitos em linhagens de células tumorais B16F10, K562 (leucemia mielogênica crônica humana) e células não tumorais MA-104 (células renais de macaco). O tratamento com as tinturas mãe de Va apresentaram atividade anticâncer contra as linhagens de células tumorais B16F10 e K562 mostrando citotoxicidade tumoral seletiva com indução de apoptose e efeitos no ciclo celular (MELO *et al.*, 2018).

Todavia, um estudo utilizando protocolo de diluições alternadas de extrato aquoso de Va mostraram que, animais portadores de tumor de Ehrlich na forma ascítica, apresentaram melhora da qualidade de vida após o tratamento com esse protocolo. Embora não tenha sido observado aumento na sobrevida, foi evidenciado pelo maior consumo de alimento e menores efeitos imunossupressores do tumor sólido ao promover a recuperação das subpopulações linfocitárias no baço, especialmente das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, para níveis comparáveis aos animais livres de tumor (CARVALHO, 2015). O tratamento com diluições alternadas ainda foi capaz de reduzir o crescimento tumoral no tecido subcutâneo, enquanto o tratamento somente com Va na potência 3DH reduziu em quase 100% o crescimento tumoral no tecido subcutâneo, sem induzir necrose local e sem modificar parâmetros imunológicos. No entanto, todos os protocolos testados no estudo, aumentaram a intensidade de edema no sítio primário do tumor, sugerindo ação pró-inflamatória local (BONAMIN *et al.*, 2019).

Estudos preliminares do grupo de pesquisa, que buscou investigar possíveis diferenças nos efeitos dos extratos de Va obtidos de hospedeiros diferentes (*Quercus robur* e *Abies alba*), colhidos nas estações de inverno e verão sobre células de melanoma B16F10, além de avaliar os efeitos dos medicamentos homeopáticos de Va preparados em diferentes escalas de diluição sobre células de melanoma B16F10, mostrou que as TMs de Va de *Abies alba* e *Quercus robur*, obtidos no verão, promoveram diminuição do metabolismo celular, aumento na população de células

em processo de morte por necrose com alta citotoxicidade e que o estresse oxidativo variou dependendo da espécie, além de haver modulação no perfil inflamatório, alterações morfológicas significativas de sofrimento e morte celular com apenas 1 hora de tratamento (DO PRADO, 2021).

Já em relação às ultradiluições, Do Prado (2021) mostrou que houve modulação dos processos celulares, tanto com relação ao metabolismo, quanto com relação à sua replicação e estresse oxidativo, bem como alterações nos padrões de inflamação, mitose e migração. As potências 12DH, 200CH e 5LM de Va de *Quercus robur* de verão apresentaram diminuição da viabilidade celular, diminuição na produção de EROS em relação a carboplatina, alterações sugestivas de mitose, sendo que o tratamento com Va 12DH também apresentou diminuição no metabolismo. Já a diluição de Va 200CH de *Quercus robur* de verão induziu maior morte por necrose. Todos os tratamentos apresentaram diminuição na produção da citocina MCP1 (proteína quimiotática de monócitos-1) que é uma citocina pró-inflamatória importante no processo de infiltração leucocitária no melanoma, além de estimular a secreção de outras citocinas, como IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e fator TGF- $\beta$ . Tanto sua presença, como a das citocinas subsequentes à sua ação, possuem um efeito protetor contra o crescimento tumoral no melanoma murino B16F10 *in vivo* (NAKASONE *et al.*, 2012; DO PRADO, 2021).

Embora a eficácia clínica e os benefícios associados à sobrevida dos tratamentos com Va continuem sendo contestados, estudos têm demonstrado suas propriedades antitumorais e imunomoduladoras (BONAMIN *et al.*, 2017; FELENDÁ *et al.*, 2019).

Conforme explanado acima, estudos tanto *in vivo* como *in vitro* demonstraram os efeitos do Va como um potente antitumoral contra diferentes tipos de tumores. Entretanto, ainda são inexistentes os trabalhos que utilizaram as TMs e diferentes escalas homeopáticas no tratamento *in vivo* com Va no intuito de observar o desenvolvimento de células de melanoma. Diante das evidências do aumento de indivíduos com melanoma por ano e, a elevada procura por terapias complementares de fácil acesso, baixo custo e que proporcionem melhor qualidade de vida aos pacientes com câncer, faz-se necessário promover novos estudos para a otimização do uso de tais medicamentos na oncologia prática. Assim, considerando a escassez de dados na literatura sobre os efeitos de ultradiluições de Va preparadas segundo a Farmacotécnica Homeopática clássica e os dados *in vitro* obtidos por Do Prado (2021)

em modelo de melanoma utilizando as TMs e ultradiluições de Va coletado em diferentes estações e de diferentes árvores hospedeiras, o presente estudo fornecerá dados inéditos dos efeitos *in vivo* de TM de Va e de diferentes escalas de diluição. A seguir, será apresentado a versão do artigo que será encaminhado a revista *Research in Veterinary Science*.

## REFERENCIAS

ACHKAR, T.; TARHINI, A.A. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. **J Hematol Oncol**, v. 10, n. 1, 2017.

ALMEIDA, V. P. *et al.* Investigations on the morpho-anatomy and histochemistry of the European mistletoe: *Viscum album* L. subsp. *Album*. **Nature**, v.13: 4604. 2023.

BAGOT, J. L. *et al.* Use of homeopathy in integrative oncology in Strasbourg, France: Multi-center cross-sectional descriptive study of patients undergoing cancer treatment. **Homeopathy**, v. 3, n. 110, p. 168-173. 2021.

BONAMIN, L. V. Descobrimos como a homeopatia funciona. **Biodilutions**. 1ª Ed. São Bernardo do Campo, 2016. Disponível em: <http://www.biodilutions.com/aplicacao/artigos/pdfs/LivroPORT-pronto.pdf>

BONAMIN, L. V. *et al.* *Viscum album* (L.) in experimental animal tumors: A meta-analysis. **Exp and Therap Med**, n. 13, p. 2723-2740, 2017.

BONAMIN, L. V. *et al.* Combination of homeopathic potencies, immune response and tumour microenvironment. In: Bonamin, L. V, Waisse, S., Eds. **Transdisciplinarity and translationality in high dilution research**. Signals and images GIRI Series. Cambridge: Cambridge Scholars Publishing; p. 211-243, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia homeopática brasileira**. 3ª ed. 2011. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a\\_edicao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf)

BRASIL, Ministério da Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia**. Brasília, Distrito Federal. 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2020 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2023 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2022.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CARVALHO, A. C. **Atividade antineoplásica de *Viscum album* (L.) em tumores experimentais: revisão crítica e estudo experimental em tumor de Ehrlich.** Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. São Paulo, São Paulo. 2015.

DO PRADO, P. I. B. **Avaliação *in vitro* do efeito de preparações homeopáticas de *Viscum album* sobre células de melanoma murino.** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. São Paulo, São Paulo. 2021.

FELENDÁ, J. E. *et al.* Antiproliferative potential from aqueous *Viscum album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and puromycin on human cancer cells. **Jour of ethnopharmacology**, v. 236, p. 100-107, 2019.

FRENKEL, M. *et al.* Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells. **Int J Oncol**, v. 36, p. 395-403, 2010.

GUIDETTI, M. V. *et al.* Incidência e importância do diagnóstico precoce de melanoma no Brasil. **Rev Bras Mult**, v. 19, n. 1, 2016.

HOLANDINO, C. *et al.* *Viscum album* homeopathic tinctures: phytochemical profile and antiproliferative activity. **Inter Jour of High Dil Research**, v. 17, n. 2, p. 07- 08, 2018.

HOLANDINO, C. *et al.* Phytochemical analysis and *in vitro* antiproliferative activity of *Viscum album* ethanolic extracts. **BMC Compl Med and Therap**, 2020.

INGRAFFEA, A. Melanoma. **Facial Plast Surg Clin North Am**, v. 21, n. 1 p. 33-42, 2013.

KALIKS, B. A indicação do *Viscum album* para tratar o câncer. Os fundamentos antroposóficos do tratamento do câncer com medicamentos elaborados a partir do *Viscum album*. **Art Med Ampl**, v. 37, n. 2, 2017.

MELO, M. N. O. *et al.* Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. **Saudi Pharma Jour**, v. 26, n. 3, p. 311-322, 2018.

MELO, M. N. O. *et al.* A scoping review of the genus *Viscum*: biological and chemical aspects of alcoholic extracts. **Plants**, v. 12, n. 9, 1811, 2023.

MONTEIRO, D. A.; IRIART, J. A. B. Homeopatia no Sistema Único de Saúde: representações dos usuários sobre o tratamento homeopático. **Cad Saúde Públ**, v. 23, n. 8, p. 1903-1912, 2007.

NAKASONE, Y. *et al.* Host-Derived MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  regulate protective anti-tumor immunity to localized and metastatic B16 melanoma. **The Amer J of Pathol**, v. 180, n. 1, p. 365–374, 2012.

OLIVEIRA, G. C. A. *et al.* Mandibulectomia parcial em cão com melanoma: Relato de caso. **PUBVET**. v.13, n.3, p.1-5, 2019.

PENALOZA, E. *et al.* Comprehensive metabolome analysis of fermented aqueous extracts of *Viscum album* L. by liquid chromatography–high resolution tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 25, n. 4006, 2020.

ROCHA, J. G. **Possíveis aplicações para medicamentos homeopáticos na medicina veterinária**. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Curso de Medicina Veterinária. 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/200095>

SARDÁ, F. O. **Melanoma de cavidade oral em cão com metástase nos linfonodos regionais – relato de caso**. 2018. 60 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Escola Superior Batista do Amazonas, Manaus, AM, 2018.

SHANNAN, B. *et al.* Heterogeneity in melanoma. **Cancer Treat Res**, v. 167, p. 1-15, 2016.

TEIXEIRA, M. Z. Panorama mundial da educação médica em terapêuticas não convencionais (homeopatia e acupuntura). **Rev Homeop**, n. 80, v. 1/2, p. 18-39, 2017.

VAN DER WEYDEN, L. *et al.* Spontaneously occurring melanoma in animals and their relevance to human melanoma. **J Pathol**. 2020.

VIDAL, T.; FIGUEIREDO, T. O mercado brasileiro de monoclonais utilizados para o tratamento de câncer. *Cadernos de Saúde Pública*, 2018.

WAINSTEIN, A. J. A.; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Rev Col Bras Cir**, v. 31, n. 3, 2004.

## II. ARTIGO - Periódico para submissão: Research In Veterinary Science

### ESTUDO DOS EFEITOS *IN VIVO* DE PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DE *Viscum album* NO MODELO DE MELANOMA MURINO

Thaís Cristina da Silva <sup>a</sup>, Sandra Augusta Gordinho Pinto <sup>a</sup>, Débora de Oliveira Mares Silvestro <sup>a</sup>, Ivana Barbosa Suffredini <sup>a</sup>, Carla Quaresma Holandino <sup>b</sup>, Leoni Villano Bonamin <sup>a</sup> e Elizabeth Cristina Perez Hurtado <sup>a,\*</sup>.

<sup>a</sup> Centro de Pesquisa, Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, Rua Doutor Bacelar, 1212. CEP: 04026-002. São Paulo, Brasil. (thais.silva1@docente.unip.br; sandra.pinto@docente.unip.br; debmaressilvestro@gmail.com; ivana.suffredini@docente.unip.br; leoni.bonamin@docente.unip.br).

<sup>b</sup> Laboratório Multidisciplinar de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-902, Brasil (cholandino@gmail.com).

\*Autor correspondente:

Endereço de e-mail: elizabeth.hurtado@docente.unip.br

#### Resumo

Nos últimos anos diversos autores têm mostrado os benefícios da homeopatia na melhora da qualidade de vida e sobrevida de pacientes com câncer. Dados preliminares do grupo mostraram em ensaios *in vitro*, que o tratamento de células de melanoma murino B16F10 com ultradiluições de *Viscum album* (Va) obtido da árvore hospedeira *Quercus robur* durante o verão da Suíça (Qr), nas escalas de 12DH, 200CH e 5LM mostraram diminuição tanto na viabilidade dessas células, como na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e da citocina MCP-1 quando comparadas as células tratadas com o quimioterápico carboplatina. Entretanto, os efeitos *in vivo* do tratamento com diferentes escalas homeopáticas e tinturas mães de Va no modelo de melanoma murino não foram ainda esclarecidos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com tinturas mãe (TM) de Va obtidos das árvores hospedeiras *Abies alba* e *Quercus robur* no verão da Suíça e diferentes escalas homeopáticas de Va obtido da árvore hospedeira *Quercus robur* durante o verão da Suíça em relação à sobrevida e manifestações clínicas em camundongos com melanoma. Para isto, camundongos C57BL/6 foram inoculados com células B16F10 e, após aparecimento do nódulo tumoral (aproximadamente 6 dias), foram tratados três vezes por semana com água, álcool 10%, carboplatina, tinturas mães (TM) de Va coletadas de *Quercus robur* (VaQr) ou *Abies alba* (VaAa) ou preparações ultradiluídas de VaQr nas potências de 12DH, 200CH ou 5LM, até aproximadamente 30 dias. Análises histopatológicas do tumor, baço, fígado e pulmão foram realizadas em conjunto com a quantificação de citocinas no lisado tumoral e no soro, em animais eutanasiados 14 dias após surgimento da massa tumoral. Avaliações do estado geral dos animais e do crescimento tumoral foram realizadas

em dias alternados até aproximadamente 30 dias após inoculação das células tumorais. Os resultados obtidos sugerem que os tratamentos com VaQr na 12DH e 5LM promovem aumento da sobrevida e do peso corporal, bem como uma tendência ao aumento da qualidade de vida dos animais com melanoma, visto que estes apresentaram menores manifestações clínicas quando comparados aos demais grupos de tratamento, principalmente o grupo carboplatina. Em conjunto, os dados aqui apresentados são inéditos e de alta relevância para o esclarecimento dos efeitos de Va ultradiluído no tratamento de melanoma, além de fornecer suporte a abrir novas perspectivas para estudos futuros com Va ultradiluído, principalmente na potência 5LM, como promissora terapia complementar para tumores agressivos.

**Palavras-chave:** Câncer de pele, células B16F10, homeopatia, *viscum album*, *Quercus robur*, *Abies alba*, terapias integrativas.

## 1. INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia que acomete os melanócitos que são células responsáveis por produzir a melanina, cuja função é dar coloração à pele, além de proteção contra a radiação ultravioleta. Trata-se de uma neoplasia que pode se apresentar de forma benigna ou maligna, caracterizada como nódulos geralmente pigmentados, podendo estar localizados em diversos pontos, como face, tronco, patas dos animais, entre outros. É um câncer potencialmente letal e sua incidência mundial tem aumentado ao longo dos últimos anos, sendo responsável pela maioria das mortes por câncer de pele (VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020; AHMED *et al.*, 2020; STRUB *et al.*, 2020). Além de sua conhecida importância para a saúde humana, os melanomas são comuns em cães, normalmente em raças que possuem uma maior pigmentação, sem predileção sexual, ocorrendo mais predominantemente na forma oral (62% dos casos), seguida da região cutânea (27%). Já em gatos, o melanoma é raro em qualquer região, entretanto quando apresentado, se desenvolve normalmente na região ocular e nesses casos, a metástase se apresenta em cerca de 63% dos casos (LINDOSO, 2017; VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020).

O prognóstico do melanoma maligno é desfavorável, pois embora as novas imunoterapias direcionadas mostraram melhora da sobrevida, os custos elevados destes tratamentos tornam seu acesso restrito, além de haver resistência à quimioterapia (DAVIS *et al.*, 2019; VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020; AHMED *et al.*, 2020; STRUB *et al.*, 2020). Com isso, seres humanos e tutores de animais buscam cada vez mais por tratamentos complementares, pois estes visam promover de forma integrada às práticas de medicina convencional, o bem-estar e qualidade de vida,

além de potencializarem os efeitos das terapias convencionais (KANHERKAR *et al.*, 2017; SHARMA B.; SHARMA P., 2019; BAGOT *et al.*, 2021).

Uma das terapias que vem sendo utilizadas é a homeopatia, desenvolvida há cerca de 200 anos pelo médico alemão Christian Frederich Samuel Hahnemann. As formas ultradiluídas dos medicamentos homeopáticos podem ser preparadas de acordo com três tipos principais de escalas: decimal (DH), centesimal (CH) e cinquenta-milesimal (LM) (SHARMA B.; SHARMA P., 2019; FELENDÁ *et al.*, 2019).

Entre os medicamentos utilizados no tratamento adjuvante em casos oncológicos estão os extratos de *Viscum album* (Va) usados há aproximadamente 100 anos. Entretanto, sua eficácia clínica e os benefícios associados à sobrevida continuam sendo contestados, apesar de já terem estudos que demonstrem suas propriedades antitumorais e imunomoduladoras (BONAMIN *et al.*, 2017; FELENDÁ *et al.*, 2019). O preparo dos extratos de Va segue rígidos padrões antroposóficos, que levam em consideração a árvore hospedeira e a época do ano ideal para a colheita (FELENDÁ *et al.*, 2019). Dentre as principais espécies de hospedeiros de Va estão as árvores: *Malus domestica*, *Quercus sp.*, *Ulmus sp.*, *Pinus sylvestris* e *Abies alba*. Pesquisas com *Viscum* parasita de *Malus domestica*, *Quercus sp.* e *Abies alba* colhido no verão evidenciam maior índice de viscotoxinas na sua composição química e maior mortalidade sobre culturas de células tumorais (HOLANDINO *et al.*, 2018; HOLANDINO *et al.*, 2020). Em relação aos princípios ativos existentes nos extratos de Va etanólico, os flavonóides, ácidos fenólicos e terpenóides são as classes químicas mais descritas nestas espécies, com grande potencial para aplicações biológicas, como antioxidante, antimicrobiano e hipolipidêmico (MELO, *et al.*, 2023).

Do Prado (2021) mostrou em um estudo *in vitro* com células B16F10 que, ultradiluições de Va promovem modulação dos processos celulares, tanto em relação ao metabolismo, como à sua replicação, estresse oxidativo, bem como alterações no perfil de citocinas inflamatórias. Neste contexto, autores mostraram que as potências 12DH, 200CH e 5LM de Va cuja árvore hospedeira era *Quercus robur* coletado no verão da Suíça, apresentaram diminuição tanto da viabilidade celular como da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, da citocina MCP1 (proteína quimiotática de monócitos-1), quando comparadas ao tratamento com carboplatina. Já em relação aos tratamentos com as tinturas mãe (TMs) de Va de obtidas das árvores hospedeiras *Abies alba* e *Quercus robur* e colhidas também no verão da Suíça, promoveram diminuição do metabolismo celular, aumento na população de

células em processo de morte por necrose com alta citotoxicidade, com variações do estresse oxidativo, modulação do perfil inflamatório, com alterações morfológicas significativas de sofrimento e morte celular com apenas 1 hora de tratamento (DO PRADO, 2021).

Embora estudos com preparações aquosas de Va sejam amplamente publicados, há uma escassez em relação as preparações dos extratos alcoólicos de *Viscum*. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos *in vivo* do tratamento com Va utilizando TMs das árvores hospedeiras *Abies alba* (VaAa) e *Quercus robur* (VaQr), obtidas no verão da Suíça, assim como das ultradiluições de VaQr nas potencias 12DH, 200CH e 5LM, em relação à evolução do tumor, sobrevida, e manifestações clínicas em camundongos com melanoma.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cultura de células de melanoma murino B16F10

Células da linhagem B16F10 foram mantidas em meio RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido com 10% de soro bovino fetal (SFB) e 1% de ciprofloxacina (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingir a confluência de aproximadamente 80% as células foram descoladas por breve exposição à tripsina para repique ou posteriores ensaios.

### 2.2 Preparo dos medicamentos

As tinturas mãe (TMs) do *Viscum album* foram cedidas gentilmente pela Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Carla Holandino da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Rio de Janeiro – Brasil) em uma concentração de 50% de álcool. O preparo das TMs foi realizado conforme a Farmacopeia Homeopática Brasileira, 3.<sup>a</sup> edição (BRASIL, 2011) a partir de plantas colhidas das árvores hospedeiras de *Quercus robur* (TM Qr) e *Abies alba* (TM Aa) na estação de verão da Suíça. Dessa forma, as TMs foram preparadas sempre nos dias dos tratamentos, na proporção de 1:5 (TM/ Água Mili Q estéril), com o intuito de chegar à concentração final de 10% de álcool para minimizar a toxicidade do álcool para os animais.

O preparo do veículo (álcool 30%) e dos medicamentos ultradiluídos (12DH, 200CH e 5LM) foi realizado na farmácia homeopática HN Cristiano, em São Paulo, a partir de uma alíquota da respectiva TM (TM Qr). Para tratamento dos animais, veículo e medicamentos ultradiluídos foram diluídos em água na proporção 1:3 (3 (Álcool/Água Pura Estéril Mili Q ou Ultradiluição/Água Pura Estéril Mili Q), para alcançar a concentração final de álcool de 10% também para minimizar a toxicidade para os animais. Toda manipulação dos medicamentos foi realizada em fluxo laminar e após a diluição final, os medicamentos foram filtrados usando filtro de seringa 0.22 µm (Millipore®) e colocados em frascos âmbar previamente autoclavados, para completa esterilização. Os medicamentos foram embalados em papel alumínio e armazenados, separadamente, em temperatura ambiente, local escuro e livre de campo magnético e variações de temperatura.

O quimioterápico carboplatina (B-platin – Blausiegel® - Lote: 21030649 Validade: 09/09/2022) na concentração de 10% foi obtido de farmácia especializada (Singular medicamentos especiais – Palmas/Tocantins). Os rótulos de todos os medicamentos foram substituídos por códigos desconhecidos pela equipe de pesquisa para que o ensaio fosse realizado em cego. Os códigos foram revelados apenas após a análise estatística.

### 2.3 Animais

Os ensaios foram divididos em duas etapas. Em cada etapa foram utilizados 35 camundongos fêmeas C57BL/6 *specific pathogen-free* (SPF), adultos com 8 semanas de idade, pesando entre 17 e 23 gramas (g), provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram mantidos em microisoladores, com temperatura de  $20 \pm 1$  °C e ciclo de luz controlada (ciclo de 12 horas claro/escuro), com água autoclavada e ração esterilizada por ionização, *ad libitum*. Os animais não receberam medicamento para reduzir a dor, pois estes podem interferir nas análises dos resultados. Para minimizar o estresse e sofrimento, os animais foram observados em dias alternados e, caso apresentassem sinais evidentes de desconforto ou sofrimento, os animais eram submetidos a eutanásia por decapitação usando guilhotina.

O delineamento experimental e todos os procedimentos realizados com os animais para o desenvolvimento do trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética

no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista (UNIP) conforme Protocolo N° CEUA N 6777120620 (Anexo 1).

#### 2.4 Desafio tumoral e tratamentos

Para verificar os efeitos de diferentes diluições homeopáticas e TMs de Va sobre células de melanoma murino, os ensaios foram também divididos em duas etapas, sendo que a primeira etapa buscou determinar os efeitos dos tratamentos de Va no desenvolvimento do melanoma murino e a segunda etapa buscou determinar os efeitos do Va sobre crescimento tumoral, manifestações clínicas e tempo de vida de camundongos desafiados com células de melanoma murino B16F10.

Para isso, os animais foram inoculados no flanco esquerdo, por via subcutânea (s.c) com  $1,5 \times 10^5$  células de melanoma B16F10 ressuspendidas em 100  $\mu$ L de solução salina injetável estéril, após prévia assepsia com álcool no local de injeção e em seguida, divididos em 8 grupos de tratamentos: água, álcool 10% dinamizado, carboplatina, TM Aa, TM Qr, ultradiluições realizadas a partir da TM Qr nas potências 12DH, 200CH e 5LM. Após o surgimento do tumor (aproximadamente 6 dias após a inoculação das células B16F10), os animais foram tratados 3x por semana (segunda, quarta e sexta), por via oral (v.o) com 20  $\mu$ L do respectivo tratamento (exceto o grupo carboplatina).

Como controles negativos, dois grupos foram considerados: 1) grupo água ou sem tratamento, no qual os animais receberam somente água pura estéril por via oral e, 2) grupo veículo, no qual os animais receberam por via oral veículo (solvente) utilizado para o preparo das ultradiluições (álcool 10% dinamizado). Como controle positivo, um grupo de animais foi tratado com o quimioterápico carboplatina (100 mg/kg), dose única por via intraperitoneal (i.p) (SOUZA, 2013; SOUSA, 2020), no mesmo dia de início dos tratamentos dos demais grupos. Para excluir viés relacionado ao estresse da manipulação dos animais, o grupo carboplatina recebeu também 20  $\mu$ L v.o de água do próprio bebedouro nos demais dias de tratamento, assim como os demais controles e tratamentos receberam no primeiro dia do início dos tratamentos, solução salina dose única por via intraperitoneal (i.p). O número de animais por grupo (n) foi constituído por 4 animais para os grupos controles (água, álcool, carboplatina), bem como os tratados com TM Qr e TM Aa. Já os grupos tratados com as potências

(12DH, 200CH e 5LM) foram constituídos por 5 animais cada, sendo ao todo 8 grupos experimentais.

A primeira fase durou 14 dias após o surgimento tumoral. Neste dia (14<sup>o</sup>), os animais foram eutanasiados para coleta de sangue total, massa tumoral e diversos órgãos para análises histopatológicas e/ou quantificação de citocinas do perfil Th1/Th2/Th17 no soro e no lisado tumoral (itens 2.7, 2.8 e 2.9, respectivamente). Todas as análises realizadas foram comparadas em relação ao grupo de animais sem tratamento. Já na segunda fase, avaliações em dias alternados, por aproximadamente 30 dias após inoculação das células tumorais B16F10 foram realizadas para determinar o crescimento tumoral, aspectos clínicos e tempo de vida (*endpoint*) dos animais com melanoma, após respectivos tratamentos. Análises do crescimento tumoral, peso corporal, expressões faciais (indicativas de dor ou desconforto) como: aperto orbital, protuberância do nariz, protuberância da bochecha, posição das orelhas e mudança do bigode, condição da pele (ulcerações), pêlos, alterações comportamentais como: prostração, letargia e dificuldade na movimentação foram realizadas. Caso algum animal apresentasse algum sinal de dor (conforme descrito no item 2.5), necrose nas áreas de inoculação do tumor e/ou falta de locomoção ele era submetido a eutanásia antes dos 30 dias de observação, conforme descrito no item 2.3.

## 2.5 Ensaio de *endpoint*

Após desafio tumoral, os animais foram observados em dias alternados para detecção de óbitos ou sinais que indicassem presença de ulcerações sob o tumor, dor ou dificuldade de locomoção. Em relação à avaliação da qualidade de vida, os critérios que foram levados em consideração foram: peso do animal, tamanho tumoral, presença de ulcerações, letargia e expressões faciais indicativas de dor ou desconforto.

A codificação de expressões faciais foi avaliada através de: aperto orbital, protuberância do nariz, protuberância da bochecha, posição das orelhas e mudança do bigode, conforme **Figura 1**, seguindo os seguintes escores: 0 = sem dor; 1 = dor moderada; 2 = dor severa (LANGFORD *et al.*, 2010).

Animais apresentando algum dos sinais anteriormente descritos, foram imediatamente eutanasiados por decapitação.

Figura 1: Para cada uma das cinco características, são mostradas imagens de ratos exibindo comportamento correspondente aos três valores.



Fonte: Langford *et al.*, 2010.

## 2.6 Volume tumoral e peso corporal

O crescimento da massa tumoral foi aferido em dias alternados com paquímetro digital Digimess® 100.174BL (Digimess, São Paulo, Brasil).

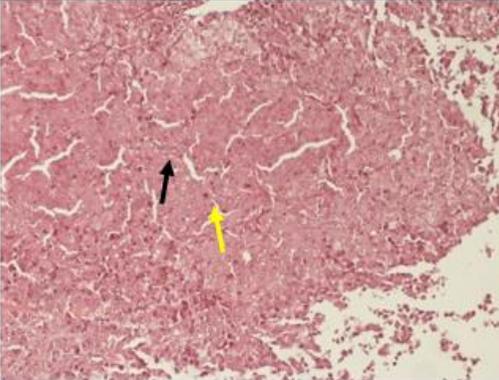
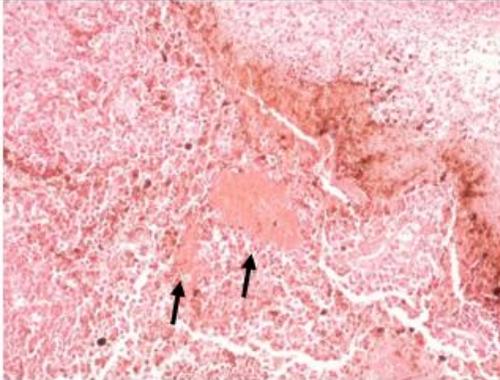
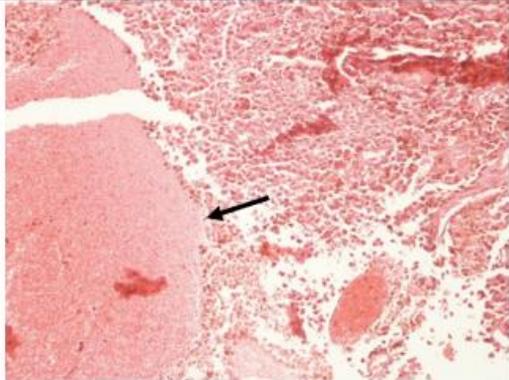
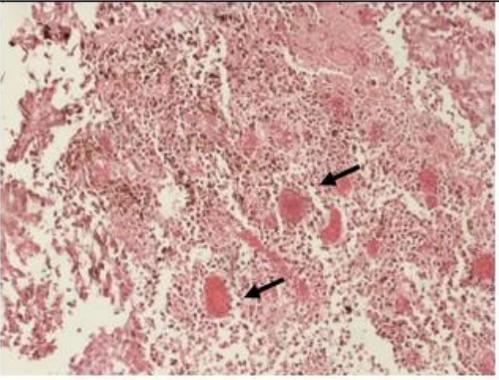
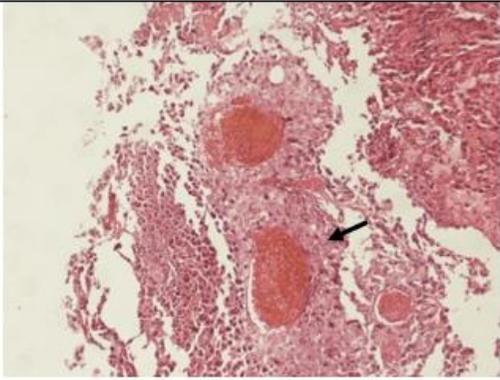
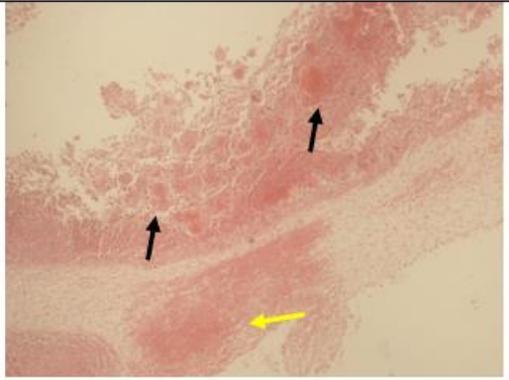
Medidas de comprimento e largura foram realizadas a partir do surgimento do nódulo tumoral (aproximadamente sexto dia após a inoculação), até o dia da eutanásia (aproximadamente vigésimo sexto dia, após inoculação das células tumorais). Para o cálculo do volume tumoral foi utilizada a equação:  $V(mm^3) = d^2 * (D/2)$ . Onde **d** representa o menor valor e **D** o maior valor, obtidos pelas medidas de comprimento e largura realizadas em dias alternados.

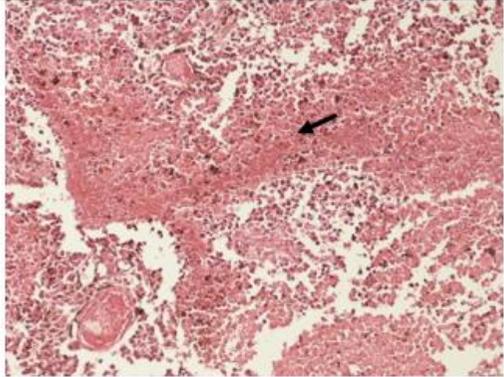
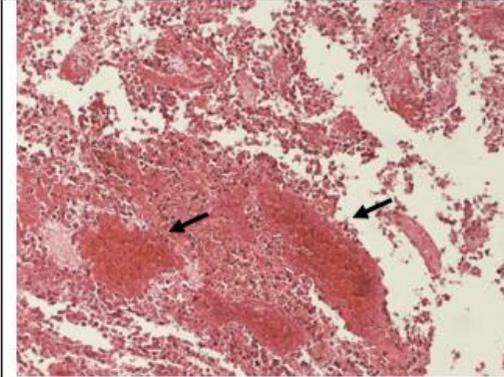
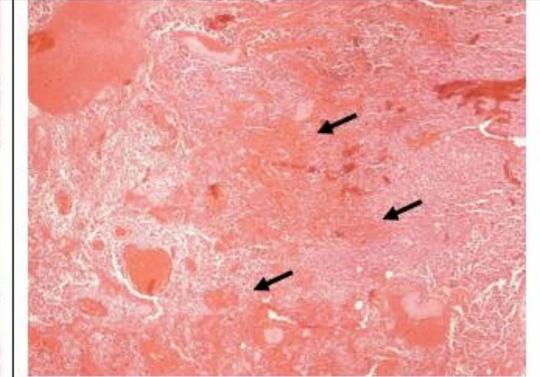
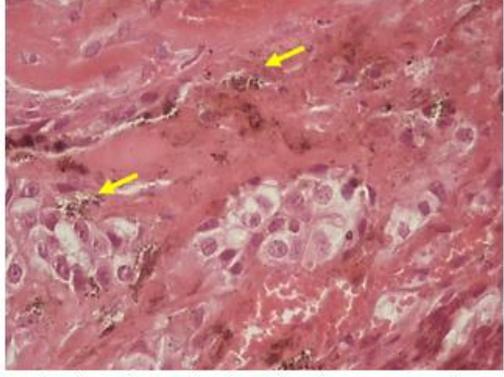
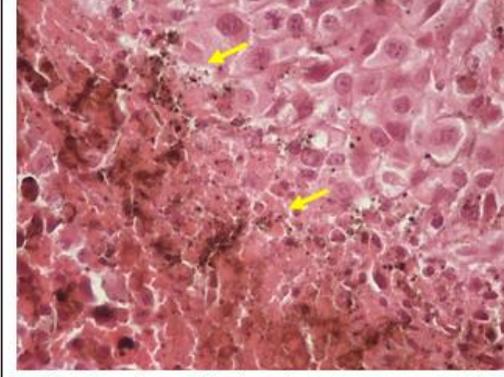
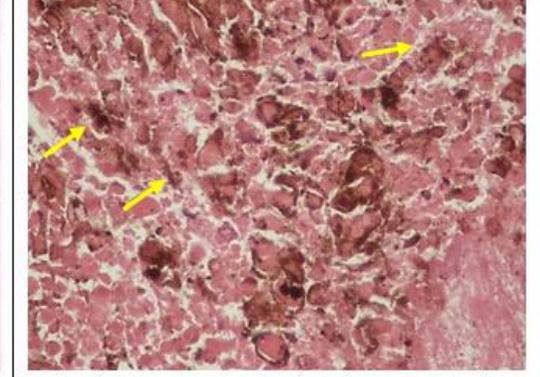
Peso em g dos animais também foi determinado antes do desafio com as células tumorais e 3x por semana.

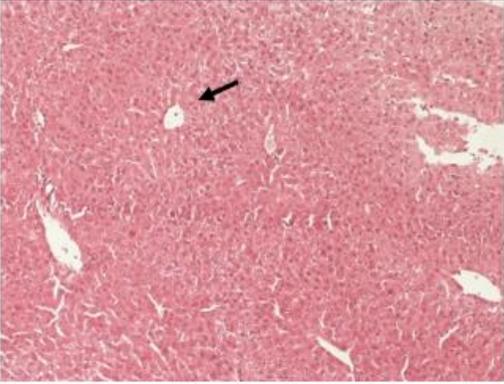
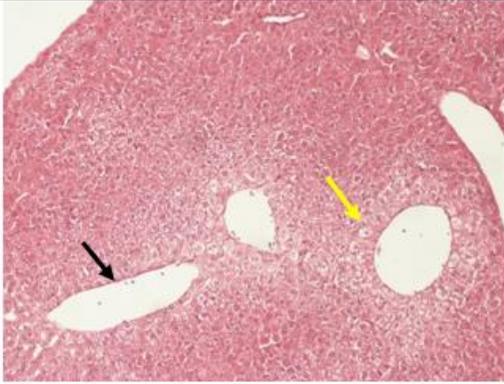
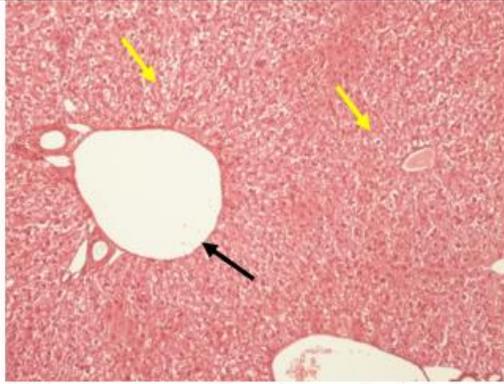
## 2.7 Análise histopatológica

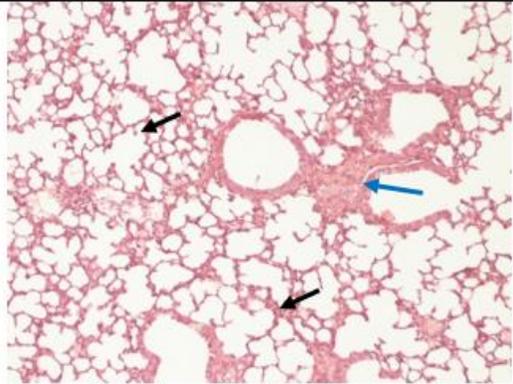
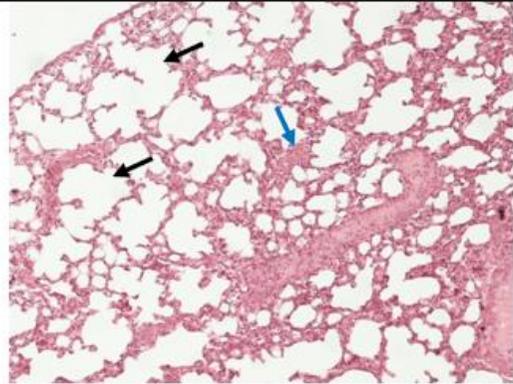
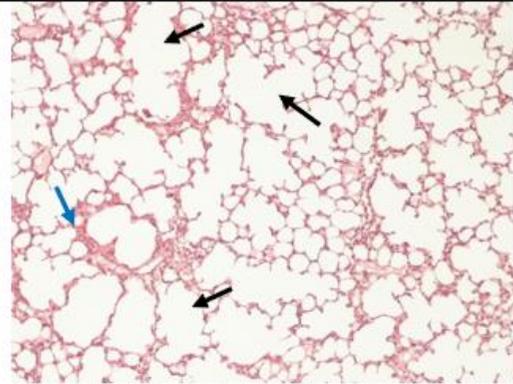
Animais desafiados com células B16F10 e tratados durante 2 semanas com os respectivos tratamentos foram eutanasiados por decapitação no 14<sup>o</sup> dia após o surgimento tumoral. Após colheita de sangue total para obtenção de soro, o baço, pulmão, fígado e massa tumoral (metade) foram colhidos para análises histopatológicas e corados por hematoxilina eosina (HE). Para coloração HE, o material colhido foi fixado em formol 10% até 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram submetidos às etapas de: desidratação, diafanização e inclusão da parafina para então serem obtidos os cortes por microtomia (4 µm). Os cortes foram desparafinados, reidratados e corados com HE. As análises das lâminas foram realizadas em microscópio óptico convencional (NIKON ECLIPSE E200, Tokyo, Japan). Para as análises dos parâmetros nas lâminas, foi atribuído score 0 = quando não identificado o item avaliado; score 1 = leve; score 2 = moderado; score 3 = severo (Tabela 1).

Tabela 1: Representação dos scores atribuídos nas análises histopatológicas e descrição das características encontradas nas avaliações.

Análise histopatológica	Score 1	Score 2	Score 3
Necrose tumoral	 <p>Focos de degeneração celular em diferentes graus de evolução. Seta preta: vacuolização citoplasmática; seta amarela: picnose nuclear.</p>	 <p>Focos de necrose coagulativa bem definidos em áreas de degeneração celular em diferentes graus de evolução (setas).</p>	 <p>Extensas áreas de necrose em áreas de degeneração celular em diferentes graus de evolução (seta).</p>
Congestão tumoral	 <p>Focos de vênulas moderadamente dilatadas com hemácias compactadas no espaço intra-vascular (setas).</p>	 <p>Focos de vênulas intensamente dilatadas com hemácias compactadas no espaço intra-vascular (seta).</p>	 <p>Extensas áreas de vênulas intensamente dilatadas, com hemácias compactadas no espaço intra-vascular (seta preta), acompanhadas ou não de áreas hemorrágicas (seta amarela).</p>

<p>Hemorragia tumoral</p>	 <p>Focos isolados de hemácias concentradas no espaço extra-vascular, por vezes em processo autolítico (seta).</p>	 <p>Focos extensos e múltiplos de hemácias concentradas no espaço extra-vascular, por vezes em processo autolítico (setas).</p>	 <p>Focos extensos e difusos de hemácias concentradas no espaço extra-vascular, por vezes em processo autolítico (setas).</p>
<p>Derrame pigmentar</p>	 <p>Grânulos de melanina (melanosomos) no espaço extra-celular em focos isolados, próximos a áreas de necrose (setas amarelas).</p>	 <p>Grânulos de melanina (melanosomos) no espaço extra-celular em múltiplos focos, próximos a áreas de necrose (setas amarelas).</p>	 <p>Grânulos de melanina (melanosomos) no espaço extra-celular distribuídos de forma difusa, próximos a áreas de necrose (setas amarelas).</p>

<p>Congestão hepática</p>	 <p>Dilatação moderada de veias centro-lobulares e hepáticas distribuídas de forma difusa pelo corte histológico (seta).</p>	 <p>Dilatação moderada a severa de veias centro-lobulares e hepáticas distribuídas de forma difusa pelo corte histológico (seta preta), por vezes acompanhada de degeneração vacuolar peri-acinar (seta amarela).</p>	 <p>Dilatação severa de veias centro-lobulares e hepáticas distribuídas de forma difusa pelo corte histológico (seta preta), por vezes acompanhada de degeneração vacuolar também difusa (setas amarelas).</p>
<p>Hiperplasia de polpa branca no baço</p>	 <p>Expansão linfocitária periférica à arteríola central, formando múltiplos focos isolados (setas).</p>	 <p>Expansão linfocitária moderada, periférica à arteríola central, formando focos isolados ou coalescentes (setas).</p>	 <p>Expansão linfocitária extensa, periférica à arteríola central, formando áreas predominantemente coalescentes (setas).</p>

<p>Atelectasia e enfisema pulmonar</p>	 <p>Focos isolados de colapamento alveolar (seta azul) – atelectasia – ou coalescência alveolar (setas pretas) – enfisema.</p>	 <p>Focos isolados de colapamento alveolar (seta azul) – atelectasia – próximos a áreas de intensa coalescência alveolar (setas pretas) – enfisema.</p>	 <p>Focos isolados de colapamento alveolar (seta azul) – atelectasia – próximos a intensa coalescência alveolar (setas pretas) – enfisema – de distribuição difusa.</p>
--	--	--	--

**Tabela 1: Análise histopatológica da arquitetura tumoral em relação a necrose, congestão, hemorragia, derrame pigmentar; congestão hepática; hiperplasia de polpa branca; atelectasia e enfisema pulmonar.** Camundongos C57BL foram inoculados com  $1,5 \times 10^5$  células de melanoma murino da linhagem B16F10 de forma subcutânea em flanco esquerdo. Animais foram tratados com água pura estéril (n 4), álcool 10% dinamizada (n 4), carboplatina (n 4), Tintura mãe de *Abies alba* (n 4), Tintura mãe de *Quercus robur* (n 4) ou com potências de *Viscum album* de *Quercus robur* obtida no verão (12DH, 200CH e 5LM - n 5 em cada grupo), respectivamente a partir do surgimento do tumor (6 dias após a inoculação) até o 14º dia após o surgimento tumoral onde foi realizada a eutanásia de todos os animais. O score 1 foi atribuído quando o achado analisado foi considerado leve; o score 2 atribuído quando o achado analisado foi considerado moderado; score 3 foi atribuído quando o achado analisado foi considerado severo. As setas representadas nas imagens, mostram os achados encontrados e suas características estão descritas abaixo das imagens.

## 2.8 Produção de lisado tumoral

Após eutanásia, tumores foram removidos cirurgicamente, pesados e, logo divididos em 2 metades. Conforme descrito no item 2.7 uma metade foi utilizada para análise histopatológica e, outra metade da massa tumoral foi pesada e mantida em volume de *cocktail* de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA), na concentração de 1%, considerando a relação de 100 µL de inibidor de protease para 100 mg de tecido. Em seguida foi dissociada utilizando Pistilos cônicos descartáveis (Fischer Scientific). Posteriormente, amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e conservado em freezer -80 °C até o momento da sua utilização para quantificação de citocinas.

## 2.9 Quantificação de citocinas por citometria de fluxo

Para avaliar a produção de citocinas relacionadas aos padrões de respostas Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-17, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) em amostras de soro e dos lisados do tumor, foi utilizada a técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) com o kit BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para isto, 20 µL de cada amostra (tanto da curva padrão, quanto das amostras a serem analisadas) foram incubados com 20 µL de uma mistura de *beads* de captura e 20 µL de anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo phycoerythrin (PE). As amostras foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente e protegidas da luz. Após lavagem, a aquisição dos dados foi realizada utilizando o citômetro BD ACCURI™ C6. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análises para CBA FCAP Array *software* versão 3.0.1 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). As concentrações de cada amostra foram calculadas com base na curva padrão, realizadas conforme indicações do fabricante do kit. Para a determinação de citocinas no lisado tumoral, valores obtidos foram corrigidos de acordo com o peso da massa tumoral e calculado por grama do tumor. Amostras com concentrações abaixo do limite de detecção determinado pelo kit para cada citocina, foram consideradas com o valor = 0 pg/mL.

## 2.10 Análise estatística

Os testes de Normalidade (*Shapiro-Wilk*) e Homoscedasticidade (*Levene*) para verificar se as distribuições das amostras eram ou não paramétricas foram realizados. Após esta verificação, para amostras paramétricas foi aplicado o teste ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey ou ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Já para amostras não paramétricas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas com  $\alpha = 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (EP). Análises e gráficos foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism 8.0. Para as análises multivariadas, foram utilizadas a análise de componentes principais (PCA) e a análise de correspondência canônica (CCA), que foram realizadas pelo programa *Multivariate Statistical Package* (MVSP).

## 3. RESULTADOS

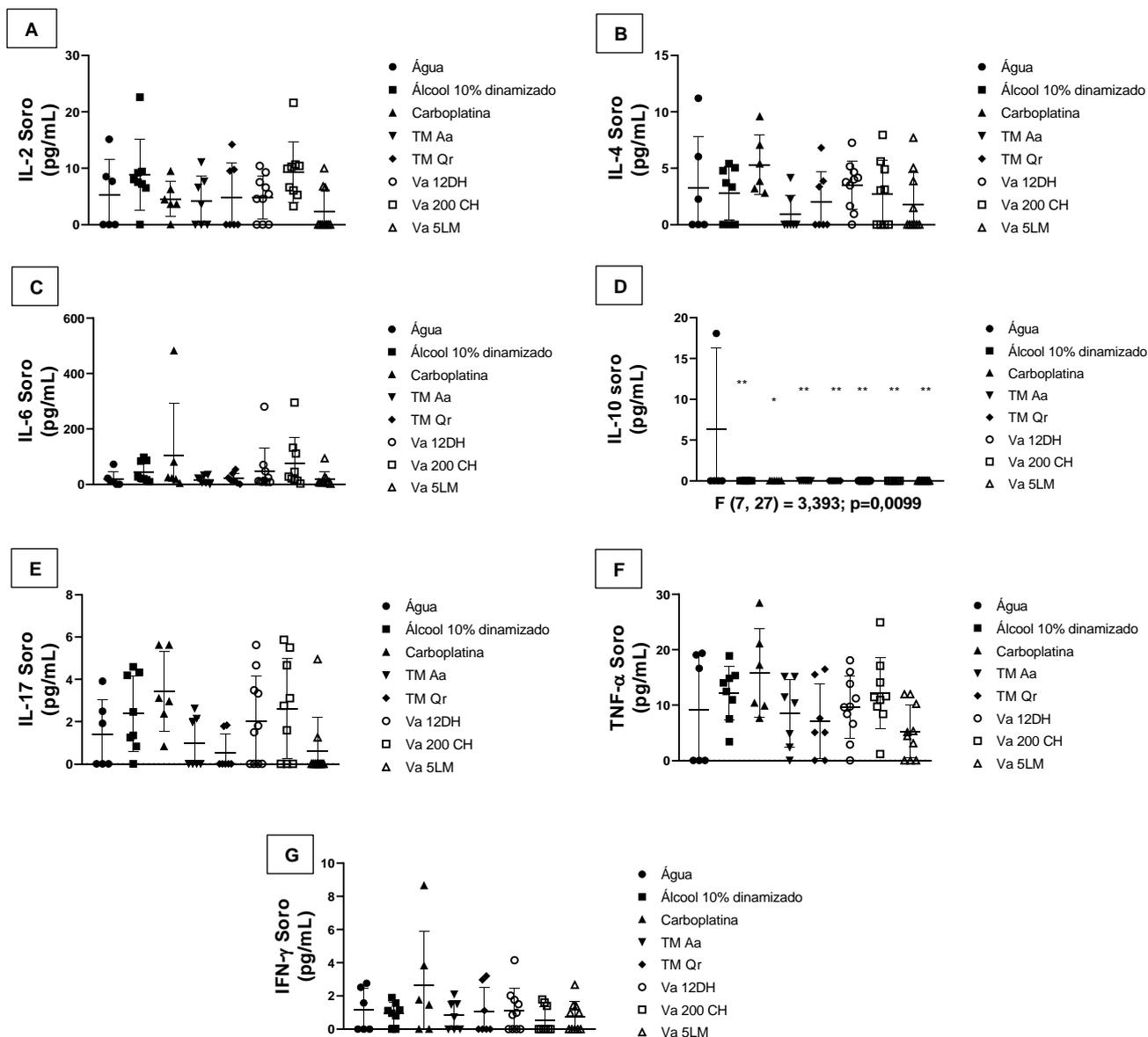
### 3.1 Perfil de citocinas no microambiente tumoral e no soro após tratamentos com ultradiluições de *Viscum album*

Replicatas de dois experimentos independentes com no mínimo 3 animais em cada grupo foram realizadas para avaliar o perfil de citocinas produzidas após cada tratamento. Análises das citocinas não revelaram diferenças significativas entre os grupos, na produção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  no soro (Figura 2). Em contraste, a IL-10 apresentou diminuição nos grupos tratados com álcool 10% dinamizado ( $p=0,0051$ ), carboplatina ( $p=0,0110$ ), TM Aa ( $p= 0,0073$ ), TM Qr ( $p= 0,0073$ ), VaQr 12DH ( $p= 0,0029$ ), VaQr 200CH ( $p= 0,0038$ ) e VaQr 5LM ( $p= 0,0029$ ), quando comparados ao grupo controle água.

Análises das mesmas citocinas presentes no microambiente tumoral não revelaram diferenças entre os grupos nos níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (Figura 3). Entretanto, apesar de não apresentar diferença estatística entre os grupos na produção dessas citocinas, é importante ressaltar que houve tendência de aumento de IL-10, IL-17 e INF- $\gamma$  no microambiente tumoral de animais do grupo água (controle) quando comparados aos demais tratamentos. Em contrapartida, o

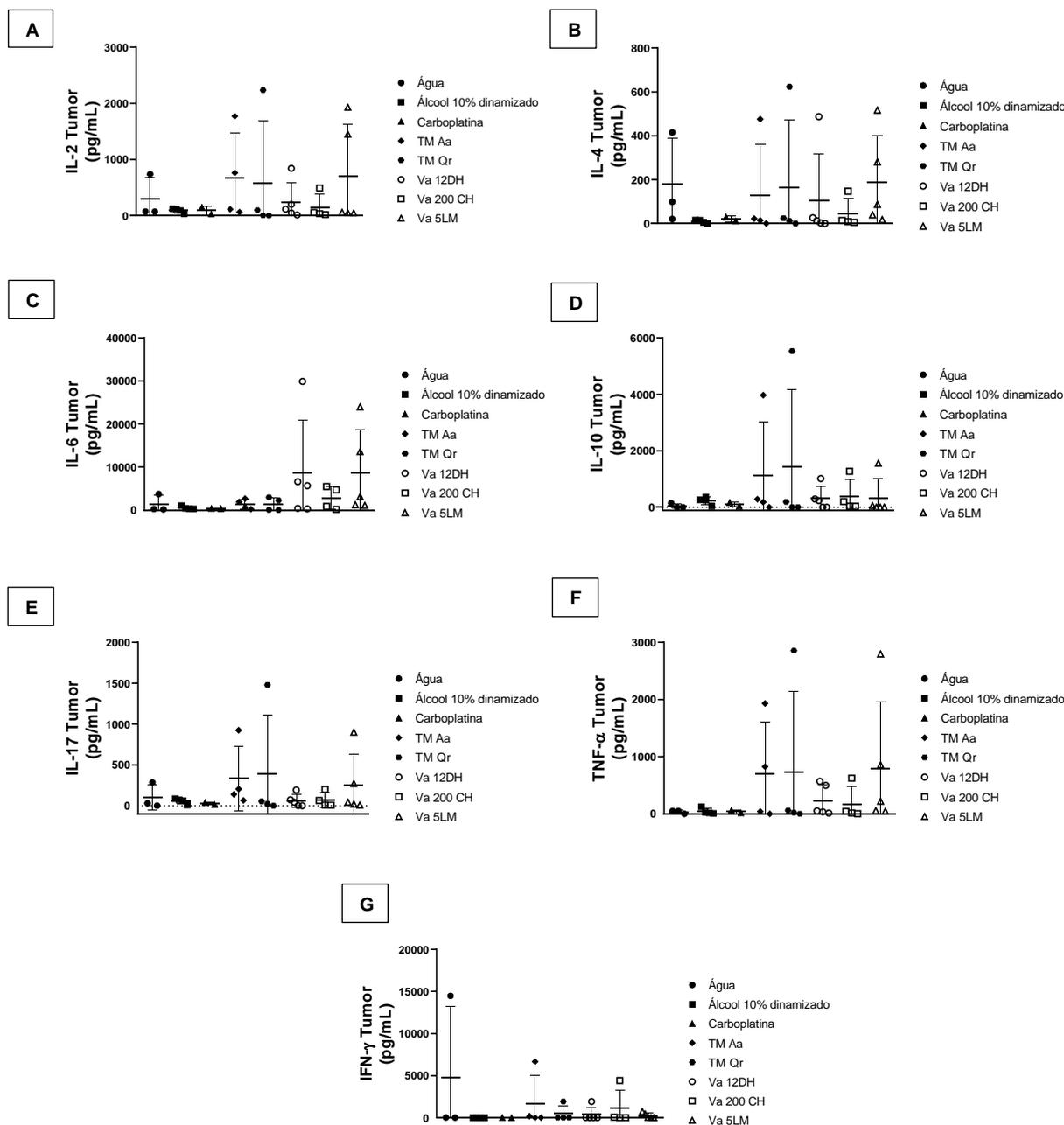
grupo tratado com TM Qr apresentou tendência ao aumento na produção de INF- $\gamma$ , porém também sem significância estatística.

**Figura 2: Perfil de citocinas no soro de camundongos com melanoma após tratamento com ultradiluições de *Viscum album* em diferentes escalas de diluição.**



**Figura 2.** Perfil de citocinas presentes no soro de animais tratados com água (n=4), álcool 10% dinamizado (n=4), carboplatina (n=4), tintura mãe de *Abies alba* de verão (TM Aa n=4), tintura mãe de *Quercus robur* de verão (TM Qr n=4) ou com potências de *Viscum album* de *Quercus robur* de verão (VaQr 12DH, 200CH e 5LM; n=5 em cada grupo) após 14 dias da inoculação das células tumorais. Animais foram tratados com seus respectivos tratamentos em dias alternados, a partir do 6 dia da inoculação das células tumorais, onde o nódulo tumoral foi evidenciado. Cada tratamento foi realizado 3x por semana até completar os 14 dias da inoculação do tumor, onde os animais foram eutanasiados para coleta de sangue total. Após separação do soro, dosagem de citocinas referentes aos padrões de resposta Th1/Th2/Th17 foram determinadas por citometria de fluxo: **A.** IL-2, **B.** IL-17, **C.** IL-4, **D.** TNF $\alpha$ , **E.** IL-6, **F.** IFN- $\gamma$  e **G.** IL-10. Comparações foram realizadas usando Anova de uma via e o teste de Kruskal Wallis. (\*) representa a significância em relação a água, (#) representa a significância em relação ao álcool e (\$) representa a significância em relação ao quimioterápico (\*= p< 0,05, \*\* = p< 0,01, \*\*\* =p< 0,0001; # =p< 0,05, ## =p< 0,01, ### =p< 0,0001; \$ =p< 0,05, \$\$ =p< 0,01 e \$\$\$ =p< 0,0001).

**Figura 3: Perfil de citocinas no microambiente tumoral de camundongos com melanoma após tratamento com ultradiluições de *Viscum album* em diferentes escalas de diluição.**



**Figura 3.** Perfil de citocinas presentes no tumor de animais tratados com água (controle n=4), álcool 10% dinamizado (controle n=4), carboplatina (controle quimioterápico n=4), tintura mãe de *Abies alba* de verão (TM Aa n=4), tintura mãe de *Quercus robur* de verão (TM Qr n=4) ou com potências de *Viscum album* de *Quercus robur* de verão (VaQr 12DH, 200CH e 5LM n=5 em cada grupo) a partir do surgimento do tumor (6 dias após a inoculação das células tumorais). Animais foram tratados com seus respectivos tratamentos por duas semanas em dias alternados (três vezes por semana) até o dia da eutanásia, 14 dias após inoculação das células tumorais. Após eutanásia, remoção cirúrgica do tumor foi realizada para obtenção de lisado tumoral e posterior avaliação no microambiente tumoral de citocinas referentes aos padrões de resposta Th1/Th2/Th17: **A.** IL-2, **B.** IL-17, **C.** IL-4, **D.** TNF $\alpha$ , **E.** IL-6, **F.** IFN- $\gamma$  e **G.** IL-10. Anova de uma via com o Teste de Kruskal Wallis, não evidenciou significância estatística entre os grupos.

## 3.2 Análise histopatológica do tumor, baço, fígado e pulmão após tratamentos

### 3.2.1 Análises de necrose, congestão, hemorragia e derrame pigmentar intratumoral

Fotomicrografias do tumor dos animais de cada grupo foram utilizadas para avaliar o padrão histopatológico dos tumores em cada tratamento onde *score* foi atribuído para cada avaliação (conforme item 2.7). Análises descritas na Figura 4 mostram que animais tratados com água, álcool 10% dinamizado e carboplatina, apresentaram extensa área necrótica, entretanto não houve significância estatística quando comparados com os animais dos grupos tratados com TM Aa, TM Qr, VaQr 12DH e VaQr 5LM. De forma semelhante, animais tratados com VaQr 200CH apresentam também tendência ao aumento da área de necrose, porém em menor quantidade que os controles, também sem significância estatística (Figura 4A).

Em relação a congestão tumoral (Figura 4B), animais do grupo controle álcool 10% dinamizado apresentaram maior congestão quando comparados ao grupo controle água ( $p= 0,0079$ ). Já os animais dos grupos tratados com TM Qr ( $p= 0,0053$ ), TM Aa ( $p= 0,0018$ ), VaQr 12DH ( $p= 0,0009$ ) e VaQr 5LM ( $p= 0,0018$ ) apresentaram menor congestão tumoral, quando comparados ao grupo controle álcool 10% dinamizado. De forma semelhante, os animais tratados com TM Aa ( $p= 0,0208$ ), VaQr 12DH ( $p= 0,0140$ ) e VaQr 5LM ( $p= 0,0208$ ) apresentaram menor congestão tumoral quando comparados com o grupo carboplatina (controle quimioterápico).

Análises da arquitetura tecidual também evidenciaram presença de hemorragia intratumoral, sendo maior nos animais do grupo controle álcool 10% dinamizado quando comparado com o grupo controle água ( $p= 0,0329$ ). Em contraste, os grupos tratados com TM Aa e VaQr 5LM apresentaram menor presença de hemorragia (Figura 4C) em área tumoral quando comparados ao grupo álcool 10% dinamizado ( $p= 0,0329$  e  $p= 0,0138$ , respectivamente).

Derrame pigmentar (Figura 4D) maior também foi observado nos animais tratados com carboplatina quando comparados ao grupo controle álcool 10% dinamizado ( $p= 0,0017$ ). Em contraste, animais dos grupos TM Qr e VaQr 200CH, apresentaram menor derrame pigmentar quando comparados ao grupo carboplatina ( $p= 0,0436$  e  $p= 0,0347$ , respectivamente).

### 3.2.2 Hiperplasia de polpa branca

Fotomicrografias das lâminas de baço foram analisadas manualmente e atribuído *score* para o item avaliado (item 2.7). Foi evidenciado hiperplasia de polpa branca (Figura 4E) no grupo tratado com VaQr 5LM quando comparado ao grupo controle água ( $p= 0,0251$ ) assim como, quando comparado ao grupo álcool ( $p= 0,0251$ ).

Vale ressaltar que nos baços dos animais com melanoma sem tratamento (grupo água) foram observadas outras alterações como maior desarranjo da arquitetura, hipocelularidade e hemossiderose.

### 3.2.3 Congestão no fígado

Assim como na análise anterior, fotomicrografias das lâminas do fígado foram analisadas manualmente e atribuído *score* (item 2.7). Animais dos grupos tratados com álcool 10% dinamizado, carboplatina, TM Aa, TM Qr e VaQr 200CH, apresentaram maior congestão no fígado (Figura 4F) quando comparados ao grupo controle água ( $p= 0,0049$ ,  $p= <0,0001$ ,  $p= 0,0049$ ,  $p= 0,0049$ ,  $p= 0,0028$ , respectivamente).

Em contraste, os grupos tratados com VaQr 12DH e VaQr 5LM apresentaram menor congestão quando comparados aos controles álcool 10% dinamizado e carboplatina, ( $p= 0, 0028$  e  $p= <0,0001$ , respectivamente).

### 3.2.4 Atelectasia e enfisema pulmonar

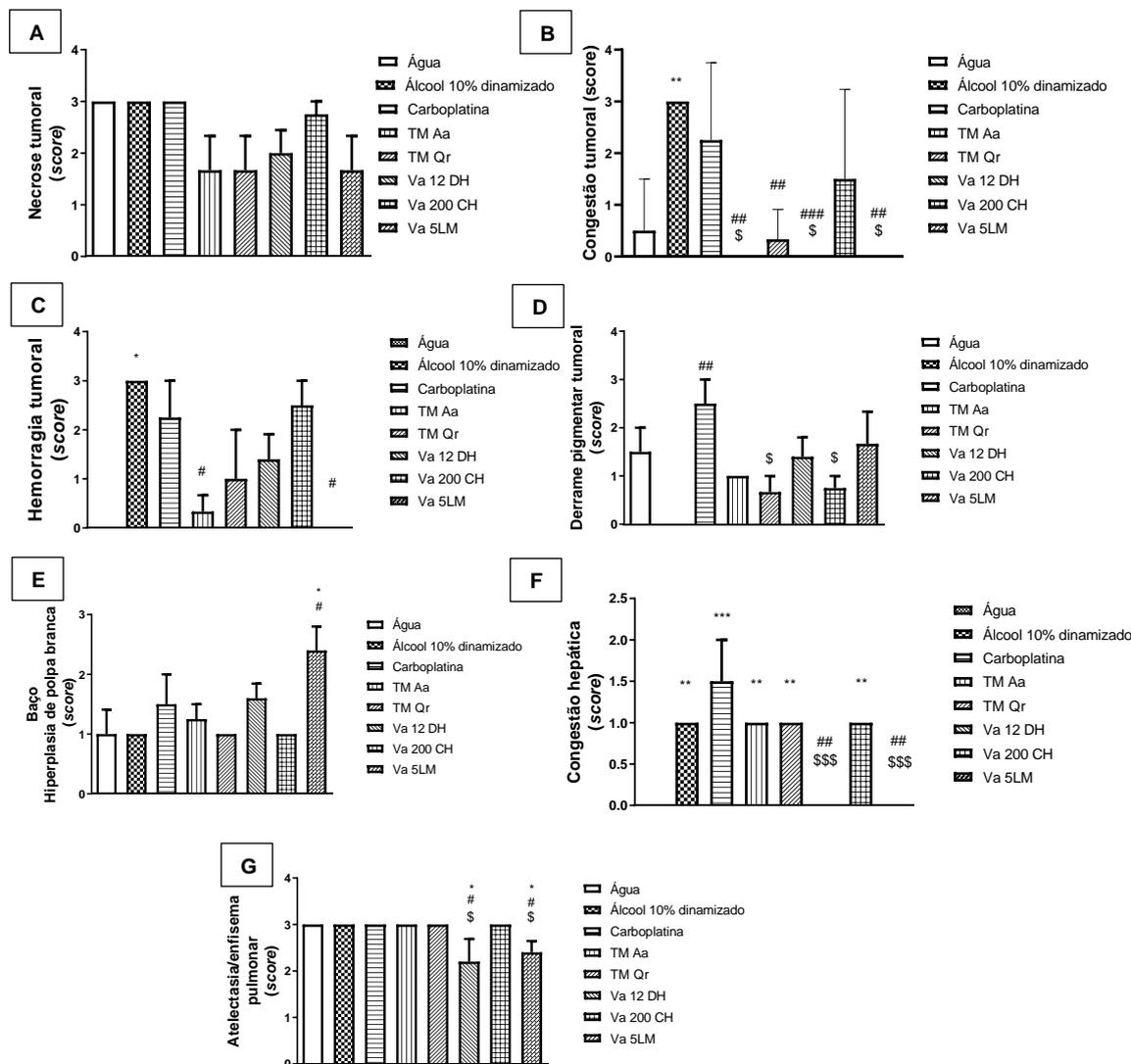
Em relação à arquitetura pulmonar após tratamentos, fotomicrografias das lâminas do pulmão foram analisadas manualmente e atribuído *score* para o item avaliado (item 2.7). Em todos os grupos foram observadas severa atelectasia e enfisema (Figura 4G), possivelmente associado a eutanásia por meio de decapitação. No entanto, os grupos tratados com VaQr 12DH e VaQr 5LM apresentaram redução significativa da atelectasia/enfisema, quando comparados aos animais dos grupos água, álcool 10% dinamizado e carboplatina ( $p= 0,0297$  para todas as comparações).

Análises de Componentes Principais (PCA) e Análises de Correspondência Canônica (CCA) foram realizadas para possibilitar maior compreensão em relação às interações de um organismo com as variáveis que o cercam. A Figura 5 mostra PCA

dos dados histopatológicos de animais inoculados com melanoma e tratados com Tinturas mães ou ultradiluições de *Viscum album* de *Quercus robur* obtido no verão, apresentou porcentagem cumulativa de 81,434 no eixo 3. Observa-se um gradiente que leva à separação dos indivíduos tratados com VaQr 12DH (identificados com o número 6) e os tratados com VaQr 5LM (identificados com número 8) no primeiro eixo do indivíduo carboplatina (identificados com o número 3) no segundo eixo. Em termos biológicos, mostra uma tendência de que os indivíduos tratados com VaQr 12DH e VaQr 5LM possam apresentar características individuais relativas a necrose tumoral, hemorragia tumoral, congestão tumoral, derrame pigmentar, hiperplasia de polpa branca, atelectasia/enfisema, congestão hepática o que pode indicar condições distintas associadas aos tratamentos.

A Figura 6 representa uma CCA considerando as análises histopatológicas, em função da produção das interleucinas. Nota-se que os indivíduos carboplatina (identificados com o número 3) se destacam dos demais indivíduos e que várias interleucinas estão influenciando esses indivíduos, tais como: IL-2, IL-4, IL-6, IL-17 e TNF- $\alpha$ . Já em relação aos indivíduos VaQr 12 DH, VaQr 5LM, TM Aa e o controle água, estão sendo mais influenciados pela IL-10. A porcentagem cumulativa foi de 84,086 no eixo 2.

**Figura 4: Análises da arquitetura tecidual no tumor, em relação a necrose, congestão, hemorragia e derrame pigmentar tumoral; hiperplasia de polpa branca; congestão hepática; atelectasia/enfisema pulmonar após tratamentos com ultradiluições de *Viscum album* em diferentes potências homeopáticas.**



**Figura 4. Avaliação da arquitetura tecidual no tumor, baço, fígado e pulmões.** Análise de necrose, congestão, hemorragia, derrame pigmentar no tumor, hiperplasia de polpa branca no baço, congestão hepática e atelectasias/enfisema pulmonar foram avaliados atribuindo score para cada item avaliado, sendo 0 quando não foram identificadas alterações, 1 para achados leves, 2 para achados moderadas e 3 para severos. As diferenças estatísticas foram representadas nos gráficos, onde (\*) representa a significância em relação a água, (#) representa a significância em relação ao álcool e (\$) representa a significância em relação ao quimioterápico (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,0001$ ; \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  e \$\$\$  $p < 0,0001$ ). Teste de Kruskal Wallis.

Figura 5. Análise dos componentes principais (PCA) realizada com dados da arquitetura tecidual dos indivíduos após tratamentos com tinturas mães e ultradiluições de *Viscum album*. A sequência numérica é relativa a cada grupo de tratamento com seus respectivos indivíduos .

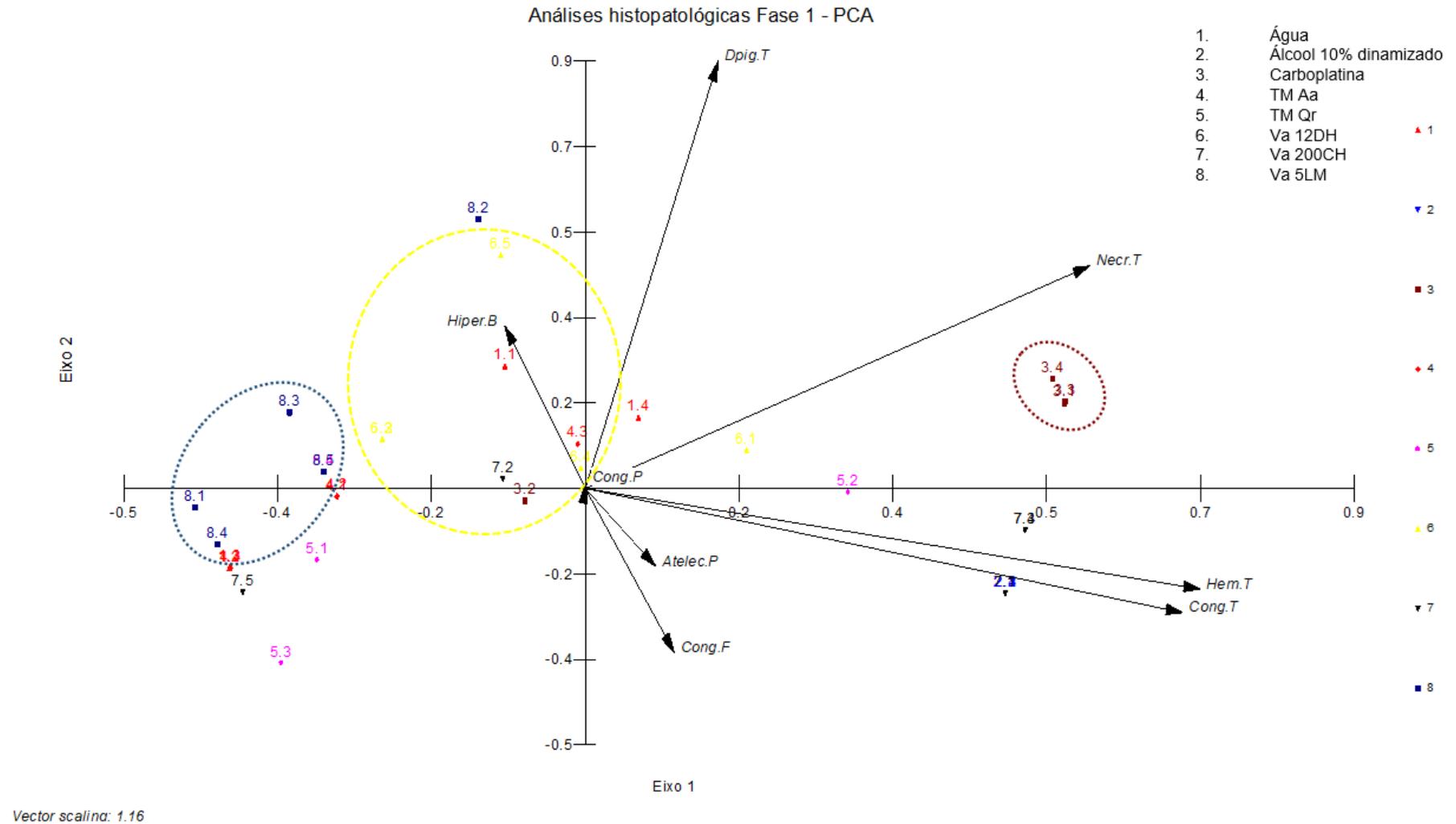
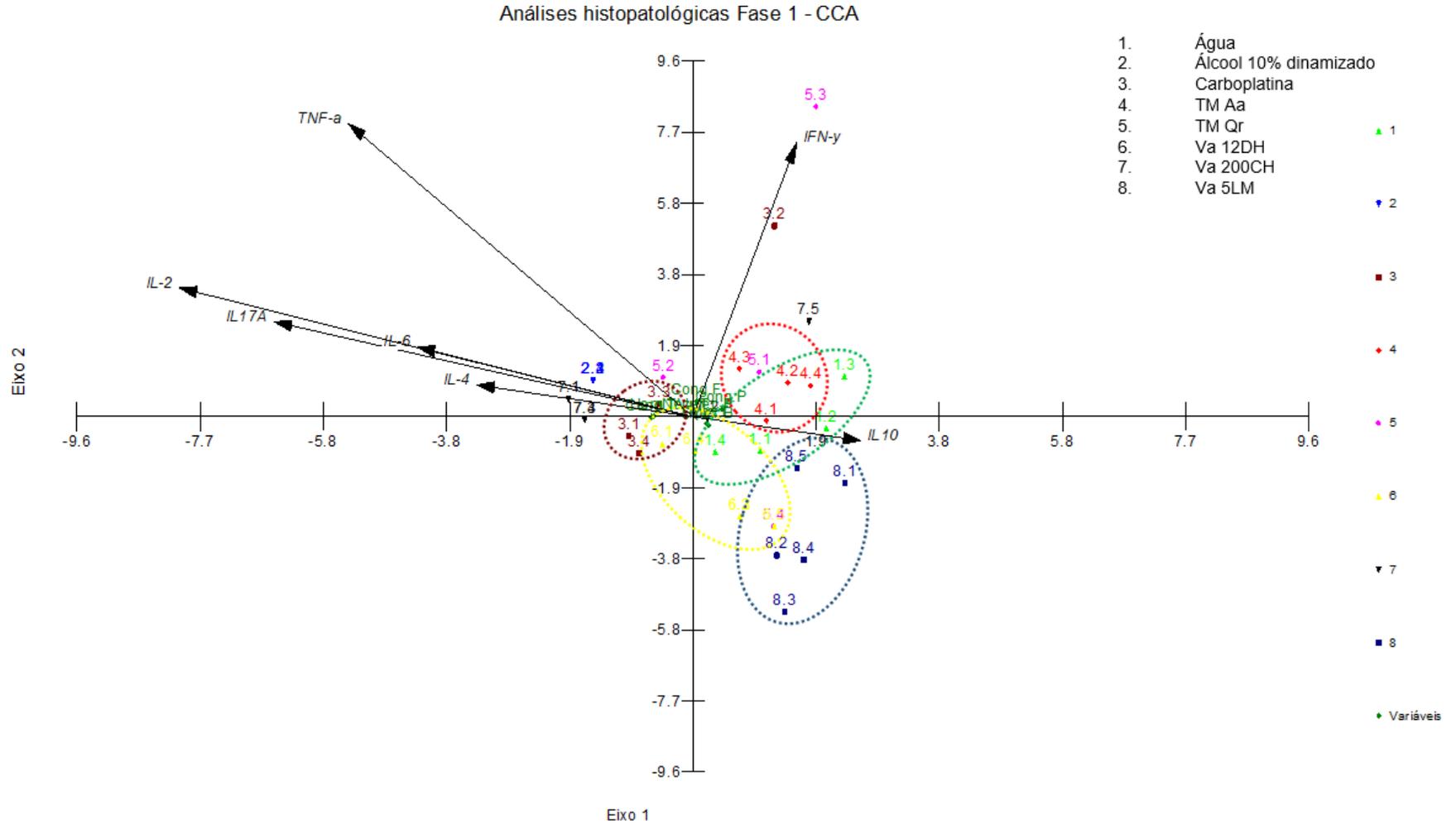


Figura 6. Análise de correspondência canônica (CCA) realizada com dados da arquitetura tecidual de animais inoculados com melanoma e tratados com Tinturas mães ou ultradiluições de *Viscum album* mostrando as variáveis climáticas (interleucinas). A sequência numérica é relativa a cada grupo e os respectivos indivíduos que o compõem.



### 3.3 Efeitos do tratamento com ultradiluições de *Viscum album* no desenvolvimento tumoral, peso corporal e sobrevida

Análises da evolução do crescimento tumoral por aproximadamente 30 dias foram determinadas pelo valor médio das medidas do volume tumoral de cada grupo em função do tempo após desafio com as células tumorais, mostraram que animais com melanoma, tratados com VaQr 12DH apresentam volumes tumorais maiores nos dias 14, 16 e 19 quando comparados aos animais tratados com o quimioterápico carboplatina ( $p= 0,0369$ ,  $p=0,0043$  e  $p= 0,0230$ , respectivamente, Figura 7A).

No décimo sexto (16<sup>o</sup>) dia, também foi observado que houve aumento do volume tumoral no grupo tratado com TM Aa quando comparado ao grupo carboplatina ( $p=0,0153$ ). Esse padrão se manteve no décimo nono (19<sup>o</sup>) dia quando comparado as médias ( $p= 0,0248$ ).

No décimo nono (19<sup>o</sup>) dia, o grupo carboplatina mostrou diminuição do volume tumoral quando com comparado ao grupo água ( $p= 0,0058$ ) e ao grupo álcool 10% dinamizado ( $p= 0,0294$ ).

O grupo tratado com TM Qr no décimo nono (19<sup>o</sup>) dia apresentou volume tumoral maior quando comparado as médias dos grupos água ( $p= 0,019$ ) e carboplatina ( $p= <0,0001$ ).

O grupo tratado com VaQr 200CH mostrou aumento do volume tumoral no décimo nono (19<sup>o</sup>) dia, quando comparado aos grupos álcool 10% dinamizado ( $p= 0,0348$ ) e carboplatina ( $p= 0,0155$ ). Essa tendência se manteve no vigésimo primeiro (21<sup>o</sup>) dia quando comparado a média do grupo álcool 10% dinamizado ( $p= 0,0069$ ).

Já o grupo tratado com Va 5LM também demonstrou aumento do volume tumoral no décimo nono (19<sup>o</sup>) dia quando comparado ao grupo carboplatina ( $p= 0,0405$ ).

Em relação aos pesos da massa tumoral, conferida após ressecção cirúrgica dos tumores realizada após necropsia, estes foram pesados e a média dos valores do peso de cada grupo de tratamento comparada com os grupos controles água, álcool 10% dinamizado e carboplatina. As análises mostraram que, os animais tratados com VaQr 12DH apresentaram peso do tumor (g) significativamente maior quando comparado com o grupo carboplatina ( $p= 0,0165$  - Figura 7B), correlacionando com o volume tumoral.

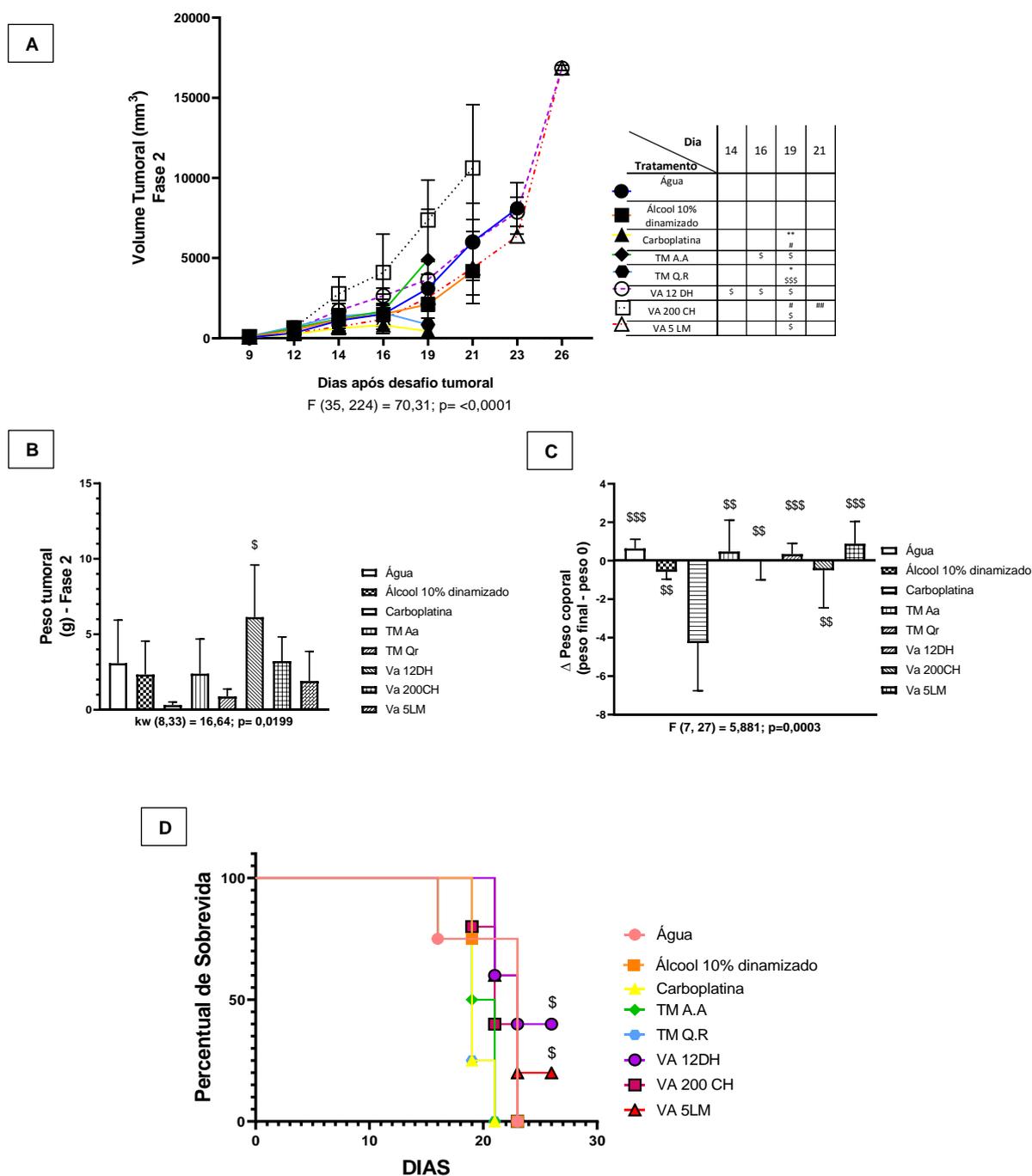
Uma vez que a progressão tumoral está estreitamente associada a perda de peso em indivíduos com câncer, análises da variação de peso dos camundongos tratados ou não com tinturas mãe de *Viscum album* (Va) obtidas das árvores *Quercus robur* ou *Abies alba* no verão e, ultradiluições de Va obtidas da árvore *Quercus robur* no verão, foram realizadas considerando o delta ( $\Delta$ ) peso, onde inicialmente realizou-se o cálculo do peso final do animal menos o peso do tumor (peso final – peso do tumor). Após este resultado, para calcular o delta ( $\Delta$ ) peso, considerou-se o peso final (sem tumor) menos o peso inicial do animal (peso final – peso inicial).

Dessa forma, observou-se que animais tratados com carboplatina apresentaram menor ganho de peso quando comparados aos demais grupos controles água ( $p= 0,0007$ ), álcool 10% dinamizado ( $p= 0,0155$ ) e quando comparados aos tratamentos com TM Aa ( $p= 0,0010$ ), TM Qr ( $p= 0,0041$ ), VaQr 12DH ( $p= 0,0008$ ), VaQr 200CH ( $p= 0,0076$ ) e VaQr 5LM ( $p= 0,0002$ ) (Figura 7C).

Em paralelo, considerando que o melanoma apresenta um desenvolvimento progressivo e que animais desafiados com células de melanoma murino B16F10 apresentam curto espaço de vida, foi avaliado se os tratamentos com TMs e ultradiluições de Va influenciariam no tempo de vida dos animais.

Assim, dados apresentados na Figura 7D mostram que animais tratados com ultradiluições de VaQr 5LM ( $p= < 0,05$ ) e VaQr 12DH ( $p= < 0,05$ ) apresentaram maior período de sobrevivência quando comparados ao grupo carboplatina. Os demais grupos de tratamento não apresentaram diferença significativa em relação a sobrevivência.

**Figura 7. Influência do tratamento de *Viscum album* no desenvolvimento tumoral, peso corporal e tempo de vida de camundongos com melanoma**



**Figura 7:** Camundongos C57BL foram inoculados com  $1,5 \times 10^5$  células de melanoma murino da linhagem B16F10 de forma subcutânea em flanco esquerdo. Animais foram tratados com água pura estéril (n 4), álcool 10% dinamizada (n 4), carboplatina (n 4), Tintura mãe de *Abies alba* (n 4), Tintura mãe de *Quercus robur* (n 4) ou com potências de *Viscum album* de *Quercus robur* obtida no verão (VaQr 12DH, VaQr 200CH e VaQr 5LM - n 5 em cada grupo), respectivamente a partir do surgimento do tumor (6 dias após a inoculação) até o dia da eutanásia. A figura 7A, refere-se ao volume tumoral determinado por aproximadamente 30 dias (fase 2 do estudo). O crescimento foi determinado pelo acompanhamento do volume tumoral, realizado em 3x na semana com paquímetro. Para o cálculo do volume tumoral foram consideradas as medidas de altura e largura  $V(mm^3) = d^2 * (D/2)$ . Onde **d** representa o menor valor e **D** o maior valor, obtidos pelas medidas de comprimento e largura realizadas

em dias alternados. Para esta análise foi realizado uma Anova, de duas vias e pós-teste de Bonferroni. Já a figura **7B** representa o peso tumoral após *endpoint* que durou aproximadamente 30 dias. O tumor dos animais foi retirado durante necropsia para determinação do peso. Colunas representam a média do peso do tumor em gramas (g) por grupo de tratamento onde foi aplicado o Anova de uma via e teste de Kruskal Wallis. A figura **7C** representa o peso delta corporal, onde os animais foram pesados em dias alternados a partir do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Foi realizado o cálculo do peso considerando o peso final do animal menos o peso tumoral e após isso, calculado o delta ( $\Delta$ ) peso da seguinte maneira: Peso final menos peso inicial. Foi realizado uma Anova de uma via e pós-teste de Tukey. A figura **7D** corresponde a análise de sobrevivência onde os animais foram observados em dias alternados por aproximadamente 30 dias para detecção de óbitos ou sinais que indiquem presença de ulcerações sob o tumor, dor ou dificuldade de locomoção. Animais apresentando algum dos sinais de desconforto descritos anteriormente, foram imediatamente eutanasiados por decapitação. Os óbitos ou a eutanásia foram registrados para análise da distribuição de sobrevivência. Para esta análise, foi realizado o Teste de Kaplan Meier. As diferenças estatísticas foram representadas da seguinte maneira: (\*) representa a significância em relação à água, (#) representa a significância em relação ao álcool e (\$) representa a significância em relação ao quimioterápico (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,0001$ ; \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  e \$\$\$  $p < 0,0001$ ).

### 3.4 Manifestações clínicas apresentadas após tratamento com ultradiluições de *Viscum album*

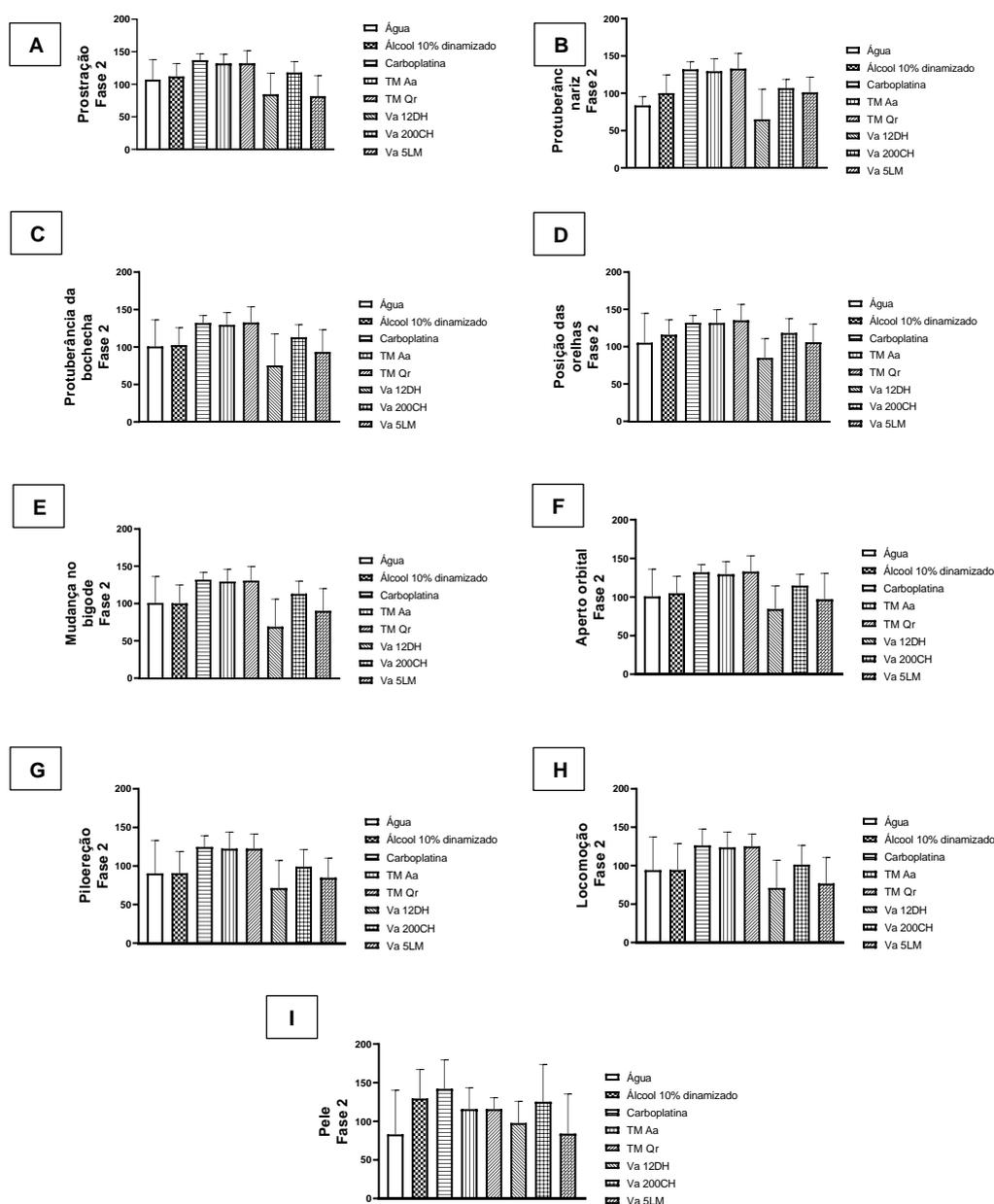
Análises das manifestações clínicas após o desafio tumoral foram realizadas em dias alternados e caso o animal apresentasse *score* 2 de ao menos uma das manifestações indicativas de dor ou desconforto, tais como: prostração, ulceração no local do tumor, piloereção, dificuldade de locomoção, aperto orbital, protuberância do nariz, protuberância da bochecha, posição das orelhas e mudança do bigode, ele era imediatamente eutanasiado.

Dados mostram que animais tratados com as ultradiluições de VaQr 12DH e VaQr 5LM apresentaram tendência a menor prostração (Figura 8A) quando comparados aos controles, contudo, não houve significância estatística. Já em relação às expressões faciais, o grupo tratado com VaQr 12DH tende a apresentar menor protuberância do nariz (Figura 8B) e da bochecha (Figura 8C), menor mudança da posição das orelhas (Figura 8D) e do bigode (Figura 8E), menor aperto orbital (Figura 8F), menor piloereção (Figura 8G) e menor dificuldade de locomoção (Figura 8H) quando comparados aos controles e demais tratamentos. Entretanto, estes dados também não apresentaram significância estatística. Em relação a ulceração no local da inoculação, notou-se que animais tratados com VaQr 5LM apresentaram menos ulcerações na pele, quando comparados aos controles e demais tratamentos, contudo, também em significância estatística.

Destaca-se que devido ao número amostral limitado por grupo, essas observações são promissoras e necessitam ser melhores investigadas, sugerindo-se estudos futuros para novas avaliações.

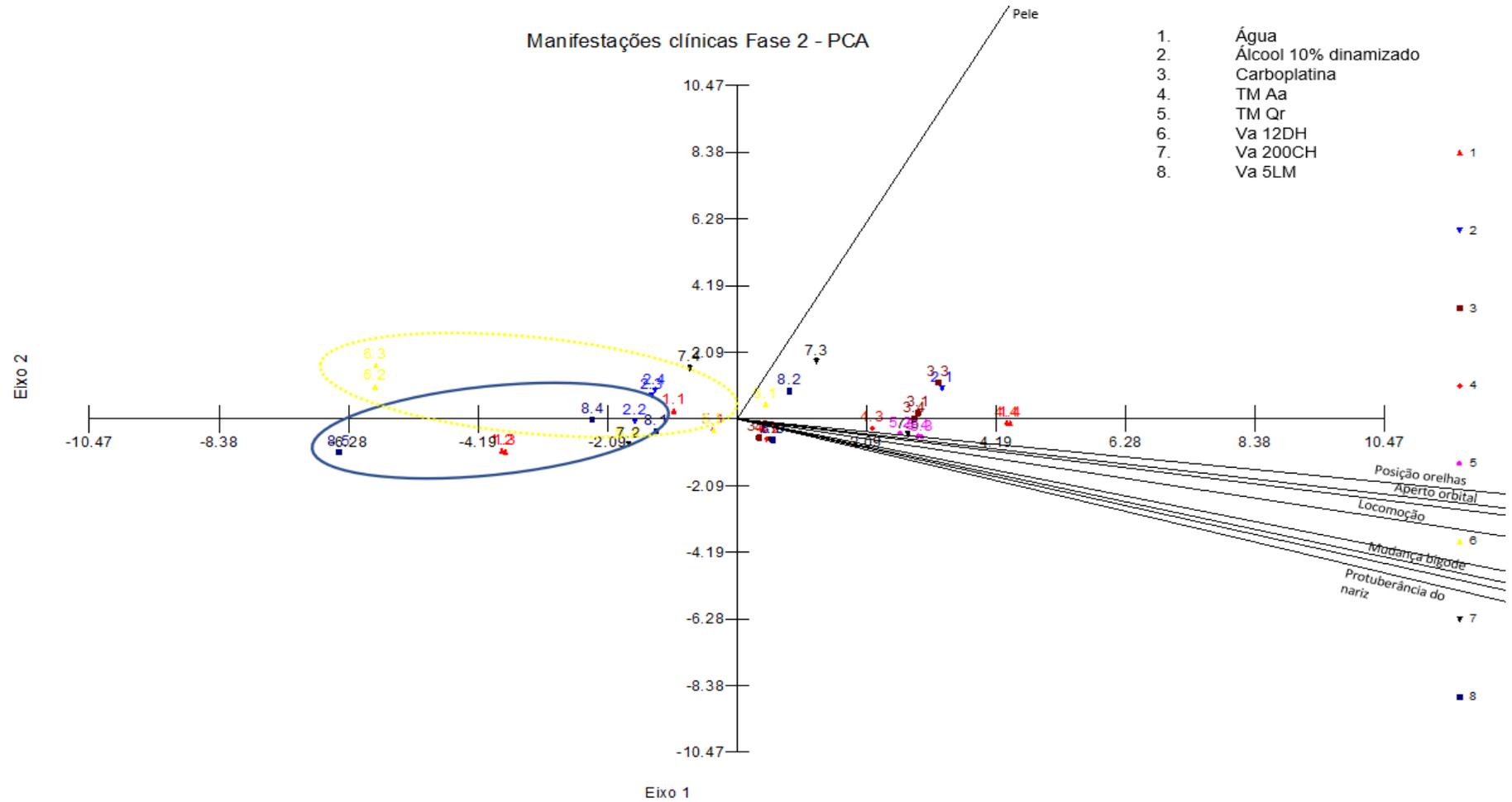
Em adição, análises de Componentes Principais (PCA) foram também realizadas para observar as interrelações entre um número de variáveis em termos de suas dimensões inerentes. A Figura 9 representa a PCA feita com dados manifestações clínicas de animais inoculados com melanoma e tratados com Tinturas mães ou ultradiluições de *Viscum album* de *Quercus robur* obtido no verão, que apresentou porcentagem cumulativa de 91,431 no primeiro eixo. Mostra um gradiente que leva à separação dos indivíduos do grupo VaQr 12DH (identificados com o número 6) e VaQr 5LM (identificados com o número 8) no primeiro eixo dos demais indivíduos no segundo eixo. Em termos biológicos, mostra uma tendência de que os indivíduos tratados com VaQr 12DH e VaQr 5Lm possam ter apresentado menos manifestações clínicas que os demais grupos de tratamentos.

**Figura 8: Efeito do tratamento com ultradiluições de *Viscum album* em relação as manifestações clínicas apresentadas em animais com melanoma.**



**Figura 8.** Camundongos C57BL/6 inoculados com  $1,5 \times 10^5$  células de melanoma murino B16F10 e tratados com água (controle  $n=4$ ), álcool 10% dinamizado (controle  $n=4$ ), carboplatina (quimioterápico  $n=4$ ), tintura mãe de *Abies alba* de verão (TM Aa  $n=4$ ), TM de *Quercus robur* de verão (TM Qr,  $n=4$ ) ou com potências de *Viscum album* de *Quercus robur* de verão (VaQr 12DH, VaQr 200CH ou VaQr 5LM,  $n=5$  em cada grupo) respectivamente a partir do surgimento tumoral até aproximadamente 30 dias de inoculação das células tumorais, observados em dias alternados para detecção de óbitos ou sinais que indicarem presença de ulcerações sob o tumor, dor ou dificuldade de locomoção. Animais apresentando algum dos sinais de desconforto descritos anteriormente, foram imediatamente eutanasiados por decapitação. Os óbitos ou a eutanásia foram registrados para análise da distribuição de sobrevivência. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o teste de Kaplan Meier: (\*) representa diferenças em relação a água, (#) diferenças em relação ao álcool e, (\$) representa diferenças em relação ao quimioterápico (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,0001$ ; \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,01$  e \$\$\$  $p < 0,0001$ ).

Figura 9. Análise de componentes principais realizada com dados das manifestações clínicas de animais inoculados com melanoma e tratados com Tinturas mães ou ultradiluições de *Viscum album*. A sequência numérica é relativa a cada grupo com seus respectivos indivíduos.



Vector scalina: 136.05

#### 4. DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que medicamentos homeopáticos usados há mais de dois séculos, podem estimular o sistema imunológico favorecendo o desenvolvimento de respostas mais eficientes frente a determinada doença. Os extratos de *Viscum album* são amplamente utilizados no tratamento do câncer, devido às suas propriedades imunomoduladoras, citotóxicas e pró-apoptóticas (BONAMIN *et al.*, 2017). Embora exista uma vasta literatura sobre o uso do Va antroposófico no tratamento de várias doenças, incluindo o câncer, pesquisas relacionadas aos efeitos de preparações de *Viscum album* ultradiluídos e ainda utilizando de escalas diferentes, ainda são escassas na literatura, o que torna os resultados obtidos neste estudo inéditos e fundamentais para a continuidade de novas pesquisas relacionadas ao tema.

Os resultados observados neste modelo experimental mostraram que animais inoculados com células B16F10 e tratados após surgimento de nódulo tumoral, com tinturas mães ou com ultradiluições de *Viscum album* obtido da árvore *Quercus robur* na estação de verão na Suíça, exibiram diversos tipos de repostas em cada parâmetro analisado.

Em relação as análises das citocinas, as repostas tipo Th1 ou perfil inflamatório têm sido associadas à melhor resposta antitumoral, onde caracteriza-se pela produção de citocinas pró-inflamatórias que favorecem a ativação de repostas celulares e ativação dos macrófagos para via clássica (macrófagos M1). Já o perfil Th2 é associado à produção de citocinas anti-inflamatórias que regulam negativamente repostas Th1, portanto podem favorecer a progressão tumoral, mediada principalmente pela participação dos macrófagos M2, chamados no microambiente tumoral de TAM (*Tumor – Associated Macrophages*) (QUAIL; JOYCE, 2013).

Em contraste com repostas do tipo Th1 e Th2, de acordo com Guery e Hugles (2015) as células do perfil Th17, possuem repostas controversas em relação aos tumores, podendo tanto favorecer a progressão tumoral pela indução de angiogênese ou pode promover repostas antitumorais pelo recrutamento de fagócitos ou células citotóxicas que desempenham repostas efetoras que inibem a progressão do tumor.

Um estudo mostrou que extratos etanólicos de *V. album* subsp. *album*, subsp. *abietis* e subsp. *austriacum* não apresentaram quase nenhuma atividade

inibitória nas citocinas inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) nas concentrações testadas (YESILADA *et al.*, 1998).

Todavia, estudo para avaliar os efeitos imunológicos *in vitro* do Va homeopático em células-tronco mesenquimais utilizando concentrações de Va nas potências D3 e 200CH: 20 e 30  $\mu$ L/mL revelou que estas não induziram alterações na produção de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , mas diminuíram os valores de IL-6 e IL-1 $\beta$ . O resultado demonstrou que Va D3 e Va 200CH podem desempenhar um papel importante como antiinflamatórios e imunomoduladores (VALLE *et al.*, 2022).

Entretanto neste estudo *in vivo*, nas análises do perfil de citocinas no soro foi possível identificar diminuição da IL-10 em todos os grupos de tratamento, exceto no grupo água. No entanto, destaca-se que esse padrão não foi linear em todo o grupo. A IL-10 é uma citocina multifuncional que exhibe propriedades imunossupressoras e anti-angiogênicas desempenhando, assim, um papel duplo e controverso na carcinogênese humana, como fator promotor e inibidor de tumor (MOCELLIN *et al.*, 2003; 2005).

Já em relação ao microambiente tumoral, um estudo mostrou que um efeito imunomodulador do *V. album* subsp. *album* extrato metanólico (1 mg/mL) foi observado pelo aumento da expressão de CD69, importante antígeno responsável pela ativação das células T, em células mononucleares periféricas do sangue, que medeia a ativação de células T CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup>. Além disso, os autores observaram que o extrato também foi capaz de aumentar a fagocitose de blastosporos de *Candida albicans* e a função de morte intracelular de neutrófilos em comparação com o controle negativo (FIDAN *et al.*, 2008).

Os resultados aqui obtidos mostraram que não houve mudança na produção de citocinas no microambiente tumoral após os diferentes tratamentos. Contudo, estudos futuros deverão ser realizados, já que o microambiente tumoral também tem papel preponderante nesse processo.

Nas análises histopatológicas, tumor, baço, fígado e pulmão foram analisados. No tumor dos animais, observou-se que os tratados com álcool 10% dinamizado e carboplatina, apresentaram extensa área necrótica quando comparados com os grupos tratados com TM Aa, TM Qr, VaQr 12DH e VaQr 5LM. Entretanto, observou-se também aumento da área de necrose em animais tratados com VaQr 200CH, porém em menor quantidade que os grupos controles, contudo, estes dados não apresentaram significância estatística.

A necrose é frequente em tumores, podendo estar associada a uma intervenção terapêutica ou ao próprio crescimento da massa tumoral. A vascularização irregular e limitada da grande maioria dos tumores faz com que existam células muito distantes de qualquer capilar estando, portanto, em falta de nutrientes e em hipóxia crônica. Dessa forma, a presença de necrose no tumor, pode estar associada a mau prognóstico. Os centros necróticos representam a origem do infiltrado inflamatório no tumor e muitos fatores celulares liberados pelas células necróticas podem atuar como estímulos intensos para migração e diferenciação de células imunes, especialmente macrófagos (ONUICHIC; CHAMMAS, 2010).

Em relação a congestão tumoral, pôde-se observar maior congestão nos animais do grupo álcool 10% dinamizado quando comparado os grupos tratados com água, TM Qr, TM Aa, VaQr 12DH e VaQr 5LM. Já quando se comparou os tratamentos com o controle carboplatina, pôde-se observar que animais tratados com TM Aa, VaQr 12DH e VaQr 5LM apresentaram menor congestão tumoral na primeira fase do estudo. A congestão é o acúmulo de sangue tecidual que ocorre através de um processo passivo ocasionado pelo comprometimento de saída do fluxo sanguíneo venoso, ocasionando redução da drenagem venosa e distensão das veias distais, vênulas e capilares (ONUICHIC; CHAMMAS, 2010).

A respeito da presença de hemorragia tumoral, notou-se em maior quantidade nos animais tratados com álcool 10% dinamizado quando comparado com os grupos água e os tratamentos TM Aa e VaQr 5LM. Entretanto, houve ainda um padrão de células epitelióides, melânicas e amelânicas com maior derrame pigmentar nos animais tratados com carboplatina quando comparados ao controle álcool 10% dinamizado e aos tratamentos com TM Qr e VaQr 200CH.

O papel do baço na resposta imune tem sido objeto de muitos estudos clínicos e experimentais uma vez que é um dos mais importantes órgãos envolvidos nas defesas contra microrganismos. O baço é o local onde são reguladas as respostas imunes sistêmicas contra o que é prejudicial ao hospedeiro. Este órgão atua como filtro para patógenos e antígenos sanguíneos, além de suas funções imunes e hematopoiéticas (BRONTE; PITTET, 2013). Dessa forma, a esplenomegalia é uma condição comum em situações como infecções e câncer, sugerindo que a diferença de tamanho encontrada pode estar relacionada com a modulação imunológica já identificada como mecanismo de ação de medicamentos homeopáticos por vários autores (REMYA *et al.*, 2014; BONAMIN *et al.*, 2012). Contudo, os resultados obtidos

neste estudo não apresentaram diferença estatística entre o peso relativo do baço dos animais em seus diferentes tratamentos.

De acordo com Bronte e Pittet (2013), a principal função da polpa vermelha é filtrar o sangue e reciclar o ferro de células vermelhas envelhecidas. Já a polpa branca é estruturalmente similar ao linfonodo, pois contém células T e B permitindo a geração de antígenos específicos e resposta imune protetora. Dessa forma, observou-se hiperplasia de polpa branca no grupo VaQr 5LM quando comparado aos grupos água e carboplatina. O aumento da polpa branca, sugere maior atividade linfóide sistêmica nesse grupo, que pode estar relacionada à resposta tumoral a antígenos solúveis.

Análises histopatológicas do fígado evidenciaram maior congestão no grupo de animais tratados com álcool 10% dinamizado, carboplatina, TM Aa, TM Qr e VaQr 200 CH quando comparados ao controle água, enquanto os tratados com VaQr 12DH e VaQr 5LM apresentaram menor congestão quando comparados aos controles álcool 10% dinamizado e carboplatina. A degeneração hidrópica foi mais evidente nos grupos tratados com VaQr 12DH, enquanto animais tratados com carboplatina apresentavam degeneração difusa. A degeneração vacuolar é uma lesão celular reversível, observada por acúmulos de substâncias em grandes vacúolos no citoplasma de células, que pode evoluir para morte celular e embora inespecífica, esta lesão esteve presente de forma acentuada em animais do grupo tratado com VaQr 12DH, o que pode estar associada ao efeito hepatotóxico da ultradiluição.

Destaca-se que um achado comum foi a presença de atelectasia/enfisema pulmonar em todos os grupos. Este possivelmente associado a eutanásia por meio de decapitação, entretanto, com redução significativa nos grupos tratados com VaQr 12DH e VaQr 5LM.

Em relação ao volume tumoral, destaca-se que os grupos tratados com TM Aa, TM Qr, VaQr 12DH, VaQr 200CH e VaQr 5LM apresentaram maior volume tumoral, especialmente quando comparados ao grupo carboplatina em função do tempo de tratamento. Todavia, notou-se ainda que houve aumento do peso tumoral no grupo tratado com VaQr 12DH quando comparado ao quimioterápico carboplatina.

É importante destacar que, durante todo o período experimental, os animais foram observados para detectar sinais que indicassem sofrimento e, uma característica comum observada em ambas as fases do estudo, de que, embora o volume tumoral fosse nitidamente maior nos grupos tratados com as tinturas mãe e ultradiluições, os animais que apresentavam piores condições em relação aos sinais

de mobilidade/locomoção, letargia, prostração e demais sinais indicativos de dor, eram os tratados com carboplatina, ainda que não represente significância estatística.

Estudos demonstram que é raro a regressão de tumores unicamente sob a terapia com *Viscum album* em dosagem normal ou baixa. Alguns estudos, como relatos de caso descrevem uma regressão tumoral parcial ou completa sob uma terapia local com alta dosagem de extratos de *Viscum album* ricos em lectina, que muitas vezes produzem febre alta e reações locais consideráveis. Isto foi relatado para câncer de fígado, carcinoma de pâncreas, câncer de mama, carcinoma de células de Merkel, tumores de pele e linfomas cutâneos, entre outros (MABED *et al.*, 2004; MATTHES *et al.*, 2005; SEIFERT *et al.*, 2005; ELDORRY *et al.*, 2008; ORANGE *et al.*, 2010; 2012; WERTHMANN *et al.*, 2013; 2014; VON SCHOEN-AGERER *et al.*, 2014).

Vale ressaltar que os dados obtidos no presente estudo em relação ao volume tumoral e peso tumoral, diferem dos dados obtidos por Carvalho (2015) que demonstrou a redução de quase 100% da massa tumoral em camundongos inoculados com tumor de Erlich e tratados com Va aquoso na potência 3DH, preparação mais concentrada de princípios ativos. Dados semelhantes foram obtidos por Han e colaboradores (2015) que avaliaram os efeitos do visco coreano (*Viscum album L. var. coloratum*) revestido com uma parede de polímero biodegradável (Eudragit<sup>®</sup>) no crescimento de melanoma em camundongos. A administração oral de 4% (430 mg/kg/dia) de visco com revestimento entérico resultou em uma redução significativa no volume do tumor no dia 14 em comparação com o grupo controle (CARVALHO, 2015).

Outro estudo com camundongos C57BL/6 portadores de melanoma subcutâneo B16F10 tratados com extratos de visco contendo compostos solúveis em água e triterpenóides solubilizados revelou que a adição de triterpenóides solubilizados aumentou os efeitos antitumorais dos extratos de visco, resultando em redução do crescimento do tumor e prolongamento da sobrevivência dos camundongos (STRÜH *et al.*, 2013).

As diferenças dos achados de estudos anteriores com os obtidos no atual trabalho podem estar associadas a escala de diluição utilizada, via de administração, a origem do *viscum* e sua árvore hospedeira, a estação do ano na qual o extrato foi obtido e a linhagem tumoral.

Em relação ao peso  $\Delta$  corporal, este estudo demonstrou que os grupos tratados com carboplatina, apresentaram menor ganho de peso quando comparados aos

demais grupos (água, álcool 10% dinamizado, TM, Aa, TM Qr, VaQr 12DH e VaQr 5LM. Animais tratados com carboplatina, em geral apresentavam piores condições clínicas para mobilidade, dinamismo e locomoção, atividades que podem estar associadas à perda de peso, pela falta de apetite ou desinteresse pela exploração.

Em relação ao tempo de vida dos animais após tratamentos, foi pré-definido período de 30 dias para *endpoint* após a inoculação de células tumorais visto a agressividade do melanoma. Entretanto, animais que apresentaram sinais que indicaram presença severa de ulcerações sob o tumor, dificuldade de locomoção, letargia e expressões faciais indicativas de dor ou desconforto (aperto orbital, protuberância do nariz, protuberância da bochecha, posição das orelhas e mudança do bigode) foram eutanasiados imediatamente. Dessa forma, o *endpoint* do estudo se deu no vigésimo sexto (26<sup>o</sup>) dia após a inoculação das células tumorais.

Análises do tempo de vida mostraram que, animais tratados com VaQr 12DH e VaQr 5LM, apresentaram maior sobrevida quando comparados ao controle carboplatina. Destaca-se que, além do tempo de sobrevida, notou-se que os animais tratados com VaQr 5LM e VaQr 12DH também se apresentavam mais ativos, com maior dinamismo e mobilidade, padrão oposto ao apresentado pelos animais dos demais grupos de tratamento, especialmente ao grupo tratado com carboplatina, especialmente aqueles tratados com VaQr 12DH, ainda que não representasse significância estatística possivelmente devido ao número amostral restrito. Este é um dado inédito e, portanto, novos estudos devem dar continuidade a este achado.

No presente estudo, não foi possível avaliar a influência dos tratamentos em relação à formação de metástases em órgãos distantes do local de inoculação das células tumorais de melanoma, devido às limitações do modelo empregado, no qual não são observadas metástases espontâneas.

## 5. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos sugere que, o tratamento com ultradiluições de *Viscum album*, obtidas da árvore *Quercus robur* colhidas no verão, em camundongos com melanoma não impediu a progressão do tumor, entretanto, sugerem que o tratamento com as potências de VaQr 12DH e VaQr 5LM favorece a melhora na sobrevida desses animais quando comparados com o quimioterápico carboplatina. Além da sobrevida, foi observado aumento do peso corporal de acordo

com o tratamento, o que denota aumento nos indicadores de qualidade de vida. Destaca-se ainda que animais tratados com VaQr 12DH e VaQr 5LM, foram os que demonstraram maior tendência melhor mobilidade/locomoção, dinamismo e menor apatia do que os demais tratamentos, ainda que, apresentassem maior volume tumoral. Esses resultados abrem perspectivas promissoras para os efeitos do Va ultradiluído, além de darem suporte à necessidade de mais pesquisas. Tais resultados podem amparar futuros testes clínicos, definição de protocolos terapêuticos de associação de compostos naturais às terapias convencionais.

Sugere-se que em estudos futuros, o VaQr 12DH e o VaQr 5LM sejam utilizados de forma complementar ao quimioterápico, assim como as Tinturas mães e ainda, que possam ser analisados as ultradiluições provenientes da TM de A.a.

**Quadro 1** - Resultados mais relevantes obtidos em todas as análises, com os tratamentos utilizados na Fase I.

RESULTADOS FASE1								
Análise	ÁGUA	ÁLCOOL 10% DIN	CARBOPLATINA	TM Aa	TM Qr	Va 12DH	Va 200CH	Va 5LM
IL-10 Soro		↓**	↓**	↓**	↓**	↓***	↓**	↓***
Score Histopatológico		Congestão tumoral - ↑** Hemorragia tumoral - ↑** Congestão fígado - ↑**	Derrame pigmentar - ↑## Congestão fígado - ↑***	Congestão tumoral - ↓## ↓\$ Hemorragia tumoral - ↑# Congestão fígado - ↑**	Congestão tumoral - ↓## ↓\$ Derrame pigmentar - ↓\$ Congestão fígado - ↑**	Congestão tumoral - ↓### Congestão fígado - ↓## Atelectasia/Enfisema Pulmonar ↓* ↓# ↓\$	Derrame pigmentar - ↓\$ Congestão fígado - ↑**	Congestão tumoral - ↓## ↓\$ Hemorragia tumoral - ↑# Hiperplasia polpa branca - ↑* Congestão fígado - ↓## Atelectasia/Enfisema Pulmonar ↓* ↓# ↓\$

As diferenças estatísticas foram representadas na tabela ao lado do gráfico, onde (\*) representa a significância em relação a água, (#) representa a significância em relação ao álcool e (\$) representa a significância em relação ao quimioterápico (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,0001; # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,0001; \$ p < 0,05, \$\$ p < 0,01 e \$\$\$ p < 0,0001).

**Quadro 2** - Resultados mais relevantes obtidos em todas as análises, com os tratamentos utilizados na Fase II.

RESULTADOS FASE 2								
Análise	ÁGUA	ÁLCOOL 10% DIN	CARBOPLATINA	TM Aa	TM Qr	Va 12DH	Va 200CH	Va 5LM
Sobrevida						↑\$		↑\$
Peso tumoral p=<0,05						↑\$\$		
Volume tumoral p=<0,0001			Dia 19 - ↓** ↓#	Dia 16 - ↑\$ Dia 19 - ↑\$	Dia 19 - ↑* ↑###	Dia 14 - ↑\$ Dia 16 - ↑\$ Dia 19 - ↑\$	Dia 19 - ↑# ↑\$ Dia 21 - ↑##	Dia 19 - ↑\$
Peso corporal	↑\$\$	↑\$\$	↓	↑\$\$	↑\$\$	↑\$\$\$	↑\$\$	↑\$\$\$

As diferenças estatísticas foram representadas na tabela ao lado do gráfico, onde (\*) representa a significância em relação a água, (#) representa a significância em relação ao álcool e (\$) representa a significância em relação ao quimioterápico (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,0001; # p < 0,05, ## p < 0,01, ### p < 0,0001; \$ p < 0,05, \$\$ p < 0,01 e \$\$\$ p < 0,0001).

## 6. CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida na ausência de relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## 7. DECLARAÇÃO DE ÉTICA

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista (UNIP) sob número do protocolo 6777120620.

## REFERÊNCIAS

AHMED, B. *et al.* Malignant Melanoma: Skin Cancer Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** 2020.

BAGOT, J. L. *et al.* Use of homeopathy in integrative oncology in Strasbourg, France: Multi-center cross-sectional descriptive study of patients undergoing cancer treatment. **Homeopathy**, n. 110, v. 3, p. 168-173. 2021.

BONAMIN, L. V. *et al.* Immunomodulation of Homeopathic Thymulin 5CH in a BCG-Induced Granuloma Model. **Evidence-Based Compl and Alter Med**, v. 2013, 15 pages, 2012.

BONAMIN, L. V. *et al.* *Viscum album* (L.) in experimental animal tumors: A meta-analysis. **Exp and Therap Med**, n. 13, p. 2723-2740, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia homeopática brasileira.** 3<sup>a</sup> ed. 2011. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a\\_edicao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf)

BRONTE, V., PITTET, M. J. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. **Immunity**, v. 39, p. 806 – 818, 2013.

CARVALHO, A. C. **Atividade antineoplásica de *Viscum album* (L.) em tumores experimentais: revisão crítica e estudo experimental em tumor de Ehrlich.** Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. São Paulo, São Paulo. 2015.

DAVIS, L. E. *et al.* Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy.** 2019.

DO PRADO, P. I. B. **Avaliação *in vitro* do efeito de preparações homeopáticas de *Viscum album* sobre células de melanoma murino.** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. São Paulo, São Paulo. 2021.

ELDORRY, A. K. *et al.* The Effect of a mistletoe preparation with defined lectin content in advanced hepatocellular carcinoma cases. **American Association for the Study of Liver Disease**. v. 424, 2008.

FELENDÁ, J. E. *et al.* Antiproliferative potential from aqueous *Viscum album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and puromycin on human cancer cells. **Jour of ethnopharmacology**, v. 236, p. 100-107, 2019.

FIDAN, I. *et al.* The Efficiency of *Viscum album* Ssp. Album and Hypericum Perforatum on Human Immune Cells In Vitro. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** v. 30, 519–528, 2008.

GUERY, L; HUGUES, S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. **Biomed Res Int.**; 2015:314620, 2015.

HAN, S.Y. *et al.* Anti-cancer effects of enteric-coated polymers containing mistletoe lectin in murine melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Mol Cell Biochem**, v. 408, p. 73–87, 2015.

HOLANDINO, C. *et al.* *Viscum album* homeopathic tinctures: phytochemical profile and antiproliferative activity. **Inter Jour of High Dil Research**, v. 17, n. 2, p. 07- 08, 2018.

HOLANDINO, C. *et al.* Phytochemical analysis and *in vitro* antiproliferative activity of *Viscum album* ethanolic extracts. **BMC Compl Med and Therap**, 2020.

KANHERKAR, R. R. *et al.* Epigenetic mechanisms of integrative medicine. **Hindawi Evi Bas Compl and Alter Med**, v. 2017, 2017.

LANGFORD, D. J. *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447-452, 2010.

LINDOSO, J. V. S. *et al.* Melanoma metastático em cão: Relato de caso. **Pubvet**, v.11, n.4, p.346-350, 2017. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/b0ab/bc4c68a0f427bd58e03e28466d6909bba99f.pdf>

MABED, M. *et al.* Phase II study of *viscum* fraxini-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. **British Journal of Cancer**. v. 90, p. 65-9, 2004.

MATTHES, H. *et al.* Treatment of inoperable pancreatic carcinoma with combined intratumoral mistletoe therapy. **Gastroenterology**.v. 128(4, Suppl. 2), n. 433. 2005

MELO, M. N. O. *et al.* A scoping review of the genus *Viscum*: biological and chemical aspects of alcoholic extracts. **Plants**, v. 12, n. 9, 1811, 2023.

MOCELLIN, S. *et al.* O duplo papel da IL-10. **Immunol**, v. 24, p. 36-43, 2003.

MOCELLIN, S. *et al.* A. Interleucina-10 e a resposta imune contra o câncer: um contraponto. **J Leukoc Biol**, v. 78, p. 1043-1051, 2005.

ONUCHIC, A. C; CHAMMAS, R. Cancer and the tumor microenvironment. **Rev Med. São Paulo**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

ORANGE, M. *et al.* Durable tumour responses following primary high-dose induction with mistletoe extracts: Two case reports. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 2, p. 63-9, 2010.

ORANGE, M. Durable regression of primary cutaneous B-cell lymphoma following feverinducing mistletoe treatment - Two case reports. **Global Advances in Health and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 16-23, 2012.

QUAIL, D. F; Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p.1423–37, 2013.

REMYA, V.; KUTTAN, G. Homeopathic remedies with antineoplastic properties have immunomodulatory effects in experimental animals, **Homeopathy**, v. 104. p. 1-9; 2014.

SEIFERT, G. *et al.* Response to subcutaneous therapy with mistletoe in recurrent multisystem Langerhans cell histiocytosis. **Pediatr Blood Cancer**. v. 536, 2005.

SHARMA, B.; SHARMA, P. K. Homeopathy and Cancer: A Review. **Jour of Appl Dent and Med Scie**, v. 5, p. 1, 2019.

SOUZA, C. M. **Carcinoma mamário murino 4T1: características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas e ensaios pré-clínicos com talidomida/carboplatina.** Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. 2013. Disponível em: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-99MH3V/1/tese\\_cristina\\_maria\\_de\\_souza.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-99MH3V/1/tese_cristina_maria_de_souza.pdf)

SOUSA, D. W. L. **Desenvolvimento do modelo experimental de mielossupressão induzida pela carboplatina: papel do óxido nítrico e da interleucina-17.** Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará. 2020. Disponível em: [https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/54116/1/2020\\_tese\\_dwlsousa.pdf](https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/54116/1/2020_tese_dwlsousa.pdf)

STRUB, T. *et al.* The “ART” of Epigenetics in Melanoma: From histone “Alterations, to Resistance and Therapies” **Theranostics**. 2020.

STRÜH, C. M. *et al.* Triterpenoids amplify anti-tumoral effects of mistletoe extracts on murine B16.f10 melanoma in vivo. **PLoS One**, v. 8, e. 62168, 2013.

VALLE, A. C. V. *et al.* Homeopathic viscum album at potencies D3 and 200CH presents cytokine modulatory effect produced by in vitro culture of mesenchymal stem cells. **Curr Res Cmpl Alt Med**. v. 6, n. 155, 2022.

VAN DER WEYDEN, L. *et al.* Spontaneously occurring melanoma in animals and their relevance to human melanoma. **J Pathol**. 2020.

VON SCHOEN-ANGERER, T. *et al.* Disappearance of an advanced adenomatous colon polyp after intratumoural injection with *Viscum album* (European mistletoe) extract: a case report. **J Gastrointestin Liver Dis**, v. 23, n. 4, p. 449-52, 2014.

WERTHMANN, P. G. *et al.* Durable response of cutaneous squamous cell carcinoma following high-dose peri-lesional injections of *Viscum album* extracts - A case report. **Phytomedicine**, v. 20, p. 324-7, 2013.

WERTHMANN, P. G. *et al.* Tumour response following high-dose intratumoural application of *Viscum album* on a patient with adenoid cystic carcinoma. **BMJ Case Reports**. 2014.

YESILADA, E. *et al.* Effects of the Turkish Subspecies of *Viscum album* on Macrophage-Derived Cytokines. **J. Ethnopharmacol**. v. 61, 195–200, 1998.

## ANEXO



Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos in vivo de preparações homeopáticas de viscum album (L.) no modelo de melanoma murino", protocolada sob o CEUA nº 6777120620 (10 000552), sob a responsabilidade de **Elizabeth Cristina Pérez Hurtado e equipe; Thais Cristina da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 07/10/2020.

We certify that the proposal "Study of the in vivo effects of homeopathic preparations of viscum album (L.) in the murine melanoma model", utilizing 70 isogenics mice (70 females), protocol number CEUA 6777120620 (10 000552), under the responsibility of **Elizabeth Cristina Pérez Hurtado and team; Thais Cristina da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 10/07/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 10/2020 a 06/2022

Área: [Patologia Ambiental E Experimental](#)

Origem: [Biotério de Experimentação](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [8 a 10 semanas](#)

N: [70](#)

Linhagem: [C57BL/6 specific pathogen-free \(SPF\)](#)

Peso: [17 a 23 g](#)

Local do experimento: Todos os experimentos envolvendo animais serão realizados no Biotério e Laboratório de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa da Universidade Paulista.

São Paulo, 26 de agosto de 2021

Prof. Dra. Maria Martha Bernardi  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Paulista