

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

CRISTIANE MORAIS

**INFLUÊNCIA DE MEDICAMENTOS ULTRADILUIDOS DE *Viscum album* L. NA
CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO**

SÃO PAULO

2024

CRISTIANE MORAIS

**INFLUÊNCIA DE MEDICAMENTOS ULTRADILUIDOS DE *Viscum album* L. NA
CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado

SÃO PAULO

2024

Morais, Cristiane.

Influência de medicamentos ultradiluídos de *Viscum album L.* na capacidade de migração das células de melanoma murino / Cristiane Moraes. - 2024.

57 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2024.

Área de concentração: Ecotoxicologia e Inovações Terapêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

1. Câncer de pele. 2. Metástases. 3. *Quercus robur*. 4. Potências homeopáticas. 5. Medicina integrativa. I. Hurtado, Elizabeth Cristina Perez (orientadora). II. Título.

CRISTIANE MORAIS

**INFLUÊNCIA DE MEDICAMENTOS ULTRADILUIDOS DE *Viscum album* L. NA
CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia Ambiental e
Experimental da Universidade Paulista –
UNIP, para obtenção do título de Mestre
em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado
Universidade Paulista - UNIP

Profa. Dra. Camila Monteiro Siqueira
Instituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista - UNIP

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – PROSUP) pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista (UNIP) por viabilizar este estudo.

À Professora Elizabeth Cristina Perez Hurtado por toda sua dedicação na orientação e desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental pelo suporte ao longo deste percurso. Manifesto minha especial gratidão à Professora Leoni Villano Bonamin e ao Professor José Guilherme Xavier pelo valioso apoio e pelas orientações fundamentais nas análises histopatológicas.

Às colegas de grupo, Giovana e Priscila, pelo apoio, pela troca de conhecimentos e pela parceria ao longo desta jornada no mestrado.

Aos colaboradores do Centro de Pesquisa da UNIP, Bruno, Cleide, Suzana e Ana, por auxiliarem da melhor maneira possível e sempre que necessário.

Ao Professor Danilo Candido de Almeida e a técnica Glória do Laboratório de Fisiologia Renal do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo auxílio e liberação para o uso do microscópio com luz polarizada utilizado para as análises da coloração de Picrosirius.

Ao Professor Hugo Pequeno e o técnico Ronaldo do Centro de terapia Celular e Molecular do departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo auxílio e disponibilização para realizar as leituras de NO no equipamento multiusuário NO *Analyzer*.

À Professora Carla Holandino pelo fornecimento do extrato de *Viscum album* L., matéria-prima essencial para o desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Amarylis, da Farmácia HN Cristiano, pelo preparo e fornecimento das ultradiluições utilizadas nesta pesquisa.

RESUMO

O extrato de *Viscum album* L. é utilizado há séculos para fins medicinais e, recentemente, como tratamento complementar para o câncer. Estudos recentes do grupo de Onco-homeopatia da UNIP utilizando ultradiluições de extratos hidroalcóolicos de *Viscum album* L. (Va), preparadas em diferentes escalas de diluição mostraram efeitos na viabilidade, atividade metabólica, produção de citocinas inflamatórias e diminuição das manifestações clínicas relacionadas à fadiga do câncer em modelos *in vitro* e *in vivo* de melanoma murino. Assim, o intuito do presente projeto foi avaliar *in vitro*, o potencial de migração das células de melanoma B16F10 antes e após tratamento com ultradiluições de Va nas potências 12X, 200C e 5LM. Para isto, células B16F10 foram tratadas ou não por 24 horas com os veículos (água ultrapura, filtrada e dinamizada na potência a ser avaliada) ou com a tintura mãe de Va obtido da árvore hospedeira *Quercus robur*, no verão suíço (TM-VaQrV), ou com ultradiluições de TM-VaQrV, nas potências de 12X, 200C e 5LM para ensaios de migração (*wound healing*) e quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO) liberados no sobrenadante de cultura após cada tratamento, nos tempos de 24 e 48 horas. Em paralelo, análises quantitativas das fibras de colágeno presentes nas biópsias de tumores de camundongos com melanoma tratados ou não com esses medicamentos foram avaliadas utilizando a coloração de picrosírius. Resultados obtidos, não evidenciaram diferenças significativas na capacidade de migração celular das células B16F10 após tratamento com tintura mãe ou ultradiluições de Va. Em contraste, o tratamento com as potências 12X e 5LM levaram à diminuição significativa dos níveis de NO observados nas células tratadas somente com o veículo. Paralelamente, análises do percentual da área de fibras de colágeno presentes nos tumores de animais tratados com esses medicamentos também não revelaram diferenças significativas em relação aos tumores de animais não tratados. Em conjunto, estes dados inéditos serão apresentados em formato de artigo para submissão na revista *Homeopathy*, com o intuito de contribuir na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares induzidos pelo tratamento com diferentes ultradiluições de Va, que levaram à melhora da qualidade de vida de animais com melanoma, observada em estudos anteriores do grupo.

Palavras-chave: Câncer de pele; metástases, *Quercus robur*; potências homeopáticas; medicina integrativa.

ABSTRACT

The extract of *Viscum album* L. has been used for centuries for medicinal purposes and more recently, as a complementary cancer treatment. Recent studies by the Onco-homeopathy group at UNIP using ultra-dilutions of hydroalcoholic extracts of *Viscum album* L. (Va), prepared in different dilution scales have shown effects on viability, metabolic activity, inflammatory cytokine production, and the reduction of clinical manifestations related to cancer fatigue in *in vitro* and *in vivo* murine melanoma models. Thus, the present study aimed to evaluate *in vitro*, the migration potential of B16F10 melanoma cells before and after treatment with ultra-dilutions of Va at potencies 12X, 200C, and 5LM. For this, B16F10 cells were treated or not for 24 hours with the vehicles (ultrapure water, filtered and dynamized at the potency to be evaluated) or with the mother tincture of Va obtained from the host tree *Quercus robur* in the Swiss summer (TM-VaQrV), or with ultra-dilutions of TM-VaQrV at potencies 12X, 200C, and 5LM for migration assays (wound healing) and quantification of nitric oxide (NO) levels released in the culture supernatant after each treatment at 24 and 48 hours. In parallel, quantitative analyses of collagen fibers in tumor biopsies of mice with melanoma, treated or not with these medicines, were evaluated using picrosirius staining. The results did not show significant differences in the migration capacity of B16F10 cells after treatment with the mother tincture or ultra-dilutions of Va. In contrast, treatment with potencies 12X and 5LM led to a significant decrease in NO levels observed in cells treated only with the vehicle. Similarly, the percentage area of collagen fibers¹ in tumors of animals treated with these medicines also did not show significant differences compared to tumors of untreated animals. Together, these novel findings will be presented in an article format for submission to the journal *Homeopathy*, aiming to contribute to the understanding of the cellular and molecular mechanisms induced by treatment with different ultra-dilutions of Va, which led to an improvement in the quality of life of animals with melanoma, as observed in previous studies by the group.

Keywords: skin cancer; mistletoe; *Quercus robur*; homeopathic potencies; integrative medicine.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	10
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1 Melanoma e Metástase	12
2 Células de Melanoma B16F10.....	15
3 Homeopatia.....	16
4 <i>Viscum album</i> L.....	18
5 Óxido Nítrico e Câncer	21
REFERÊNCIAS	23
III. ARTIGO – Periódico para submissão: Homeopathy	27
Resumo	28
Introdução	29
Material e métodos.....	31
Medicamentos e veículos.....	31
Cultura celular.....	31
Viabilidade celular pelo método de exclusão <i>Trypan blue</i>	32
Ensaio de migração celular	32
Determinação de Óxido Nítrico	33
Quantificação de colágeno pelo método de Picrosirius.....	33
Análise estatística	35
RESULTADOS	35
Ensaio de migração celular	35
Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico.....	41
Coloração de picrosirius	43
DISCUSSÃO	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	51

I. INTRODUÇÃO

Segundo dados da *World Health Organization* (WHO, 2022), o câncer é responsável por quase três quartos das mortes no mundo e pode ocorrer por causas diversas, incluindo fatores sociais, ambientais, comerciais e genéticos.

Entre os tipos de câncer, o de pele é o mais frequente no mundo, sendo o melanoma o subtipo mais agressivo (Bray *et al.*, 2024). O melanoma é uma neoplasia maligna de origem melanocitária, caracterizada por sua alta capacidade de metástase e resistência a tratamentos convencionais, tornando-se uma das formas mais agressivas de câncer de pele (Lauters *et al.*, 2024).

Atualmente, a maioria dos melanomas é diagnosticado precocemente, e apenas 10 a 15% dos melanomas cutâneos primários irão metastatizar. Essa progressão ocorre de maneira linear e gradual com a metástase sendo um evento tardio, no entanto, pode também ocorrer de forma paralela durante a formação do tumor primário. A presença de metástases em qualquer tipo tumoral é, em geral, considerada um indicador de mau prognóstico. Portanto, a identificação precoce de marcadores correlacionados à doença metastática pode favorecer estratégias terapêuticas para seu controle ou prevenção (Saud *et al.*, 2022).

Salienta-se que a metástase ocorre quando as células cancerosas escapam da massa tumoral primária e colonizam outros tecidos, adjacentes ou distantes, pela degradação da matriz extracelular e migração via circulação sanguínea ou linfática. A invasão tecidual e a formação de metástases são processos complexos que envolvem interações das células tumorais com os componentes moleculares ou celulares do local onde se desenvolvem. Alterações no acoplamento físico dessas células ao microambiente e a ativação de proteases extracelulares são fundamentais nesse processo. Importante notar que metástases macroscópicas podem surgir décadas após um tumor primário ser removido cirurgicamente ou destruído farmacologicamente (Saud *et al.*, 2022).

Além disso, Santos *et al.* (2023) destacam que, em países com alto IDH (índice de desenvolvimento humano), intervenções eficazes de prevenção, detecção precoce e tratamento têm contribuído para a redução das taxas de incidência e mortalidade por câncer. Em contrapartida, nos países em transição, essas taxas

permanecem estáveis ou em ascensão, evidenciando o desafio de otimizar recursos e fortalecer as estratégias de controle do câncer nesses contextos (Santos *et al.* 2023).

Diante desse cenário, pesquisas com modelos murinos, usando células B16F10, têm contribuído para entender melhor o comportamento do melanoma e suas interações com o sistema imunológico e o microambiente tumoral para o desenvolvimento de tratamento mais específicos e eficazes (Sun *et al.*, 2023). Contudo, apesar dos avanços da imunoterapia e das terapias convencionais, a resistência e os efeitos adversos significativos aos tratamentos resultam em desfechos clínicos insatisfatórios, evidenciando a necessidade de terapias complementares que minimizem esses efeitos (Braga *et al.* 2024).

Nessa busca por terapias complementares, o uso de ultradiluições de extratos aquosos de *Viscum album* L., preparados de acordo com a farmacopeia homeopática, são utilizados na atualidade como terapia integrativa em pacientes oncológicos, devido as suas propriedades imunomoduladoras e influência na melhora da qualidade de vida desses pacientes (Melo *et al.*, 2023). Entretanto, os mecanismos de ação desses medicamentos ainda não foram completamente elucidados.

Estudos recentes do grupo de onco-homeopatia da Universidade Paulista, avaliaram no modelo de melanoma murino, os efeitos *in vivo* e *in vitro* de ultradiluições de Va preparadas a partir de tinturas mães, obtidos de plantas colhidas das árvores hospedeiras de *Quercus robur* (TM Qr) e *Abies alba* (TM Aa) nas estações de verão e inverno da Suíça. Resultados obtidos nestes estudos mostraram diminuição de mediadores inflamatórios e melhora notável da qualidade de vida de animais com melanoma, após o tratamento com as potências 12X, 200C e 5LM de TM Qr na estação de verão (Prado, 2021; Silva, 2023). Entretanto, os efeitos destes medicamentos na capacidade de migração /metastatização de células B16F10 não foram avaliados.

Uma vez que a formação de metástase impacta na qualidade de vida do paciente oncológico, a avaliação dos efeitos de preparações ultradiluídas de *Viscum album* L. na capacidade de metastatização das células de melanoma murino pode contribuir para uma melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares induzidos pelo tratamento com esses medicamentos.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Melanoma e Metástase

O melanoma, um câncer de pele de comportamento agressivo, que surge nos melanócitos - células responsáveis pela produção de pigmento na pele, é considerado o tipo mais letal de câncer cutâneo. Esse câncer pode ser curável se identificado e tratado nas fases iniciais. Nos Estados Unidos, o melanoma ocupa a quinta posição entre os tipos de câncer mais comuns e é a principal causa de morte relacionada ao câncer de pele, sendo responsável por aproximadamente 80% dos óbitos dessa categoria (Nwafor *et al.*, 2023).

Globalmente, ele representa cerca de 1,7% de todos os casos de câncer, com taxas em ascensão principalmente nos países desenvolvidos. Embora a taxa de sobrevivência relativa de 5 anos tenha subido para 93,7%, a taxa de sobrevida para a doença em estágio avançado ainda é bastante reduzida, situando-se em 29,8%. A metástase no melanoma ocorre de maneira rápida e prejudicial, e está presente entre 40% a 60% dos pacientes em estágio avançado, levando ao prognóstico ruim e taxas de sobrevida reduzidas (Nwafor *et al.*, 2023).

O melanoma apresenta quatro subtipos histológicos principais: o melanoma de extensão superficial, que corresponde a aproximadamente 70% dos casos; o melanoma nodular, que varia entre 15% e 30%; o lentigo maligno melanoma, com incidência de 4% a 10%; e o melanoma lentiginoso acral, que representa menos de 5% das ocorrências. Embora seja mais frequentemente encontrado na pele, o melanoma pode se desenvolver em outros sistemas do corpo, incluindo os sistemas oculares, respiratório superiores, gastrointestinais e geniturinárias (Serman *et al.*, 2022).

Dentre esses subtipos, o melanoma cutâneo (MC) se destaca como o mais agressivo e mortal. Ele resulta de danos no DNA das células aparentemente que não são corrigidas, levando a alterações genéticas que fazem com que as células se multipliquem de maneira descontrolada, formando tumores malignos. Embora o MC represente cerca de 5% de todos os casos de câncer de pele, ele é responsável por aproximadamente 75% das mortes relacionadas a essa doença (Raymond; Suppa; Gandini, 2020).

Os fatores genéticos de risco para o melanoma incluem histórico familiar da doença, características como pele, cabelo e olhos claros, deficiências sem reparo do DNA e genes específicos associados ao risco de melanoma. Entre esses genes estão o inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A), CDK4, proteína-1 associada ao BRCA1 (BAP1), proteção dos telômeros 1 (POT1) e a transcriptase reversa da telomerase (TERT). Mutações nesses genes supressores de tumores aumentam significativamente a suscetibilidade ao melanoma (Yamauchi *et al.*, 2022).

O risco de desenvolver melanoma é duas vezes maior em pessoas com parentes de primeiro grau relatado com a doença, e esse risco aumenta conforme o número de familiares afetados. Indivíduos com histórico familiar de melanoma tendem a desenvolver a doença mais precocemente e frequentemente apresentam múltiplos melanomas primários. Enquanto os melanomas primários ocorrem de forma esporádica em cerca de 5% das pessoas que tiveram melanoma, esse índice sobe para 19% entre aqueles com histórico familiar da doença (Toussi *et al.*, 2020).

Para pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo, recomenda-se um programa de vigilância que inclua exames de pele, couro cabeludo, mucosa oral e área genital, realizados a cada três a seis meses ou anualmente, dependendo dos fatores de risco individuais. Nesse contexto, o uso de dermatoscopia comparativa tem sido mostrado especialmente eficaz, com a imagem dermatoscópica digital sequencial auxiliando na detecção precoce de melanomas (Zocchi *et al.*, 2021).

Outro fator de risco é a radiação ultravioleta (UV), considerada um dos principais fatores de risco externos associados a todos os tipos de câncer de pele, afetando especialmente áreas do corpo que estão mais frequentemente expostas ao sol, como cabeça e pescoço, responsáveis por quase 80% dos casos registrados. Isso indica que a exposição à luz solar, seja em intensidade elevada ou por longos períodos, também desempenha um papel significativo no desenvolvimento de tumores. No entanto, cerca de um quarto dos casos ocorre em partes do corpo que não estão frequentemente expostas à luz solar direta. (Saeed *et al.*, 2024).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou o uso de bronzeamento artificial como um carcinógeno do grupo 1, posicionando-o ao lado da fumaça do cigarro dentro da categoria dos carcinógenos mais potentes. Há evidências crescentes que associam o uso de solários, que são estabelecimentos específicos destinados ao bronzeamento artificial, à incidência de melanoma, especialmente

quando o uso começa na adolescência. Estima-se que o risco de desenvolver melanoma aumente em 15% para aqueles que utilizam solários em comparação com indivíduos que nunca fizeram uso desse tipo de equipamento (Raymond-Lezman; Riskin, 2023).

O aumento no número de nevos melanocíticos e a presença de nevos atípicos são reconhecidos como fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma. Em uma meta-análise, constatou-se que indivíduos com mais de 100 nevos têm cerca de sete vezes mais risco de desenvolver a doença. Além disso, aqueles com múltiplos nevos atípicos apresentam um risco seis vezes maior em comparação com aqueles sem nevos atípicos. Essa relação sugere que os nevos podem atuar como lesões precursoras do melanoma. Entretanto, a probabilidade de um único nevo evoluir para melanoma é bastante baixa, com um risco anual inferior a 0,0005%, assim a maioria dos nevos permanece estável e não se transforma em melanoma (Shreberk-Hassidim; Ostrowski, 2023).

Contudo, ações preventivas devem incluir uma combinação de medidas como evitar a exposição intensa ao sol; não utilizar dispositivos de bronzeamento artificial; usar proteção física como roupas, chapéus de aba larga e óculos de sol; uso de protetor solar nas áreas expostas da pele e evitar a exposição solar entre às 10 horas da manhã e às 16 horas. Essas são algumas das normas consideradas seguras para prevenção primária da doença (Garbe *et al.*, 2024). Já a identificação precoce e o rastreamento genético são fundamentais na prevenção secundária, contribuindo para a detecção antecipada de tumores com alto grau de malignidade ou resistentes a determinado protocolo terapêutico (Garbe *et al.*, 2024).

Para o diagnóstico, o reconhecimento de lesões atípicas é o primeiro passo. O método ABCDE, um acrônimo que ajuda tanto o público quanto os profissionais da saúde a identificar melanomas potenciais, destaca cinco características essenciais: assimetria, borda irregular, variação de cor, diâmetro e evolução. A assimetria indica que uma metade da lesão difere da outra, enquanto a borda irregular se refere a contornos desfocados ou com relevos. A variação de cor envolve múltiplas tonalidades na lesão, que podem ter dimensões superiores a 6 milímetros. A evolução diz respeito a mudanças no tamanho, forma ou cor ao longo do tempo. Após a identificação de uma lesão suspeita, a realização de uma biópsia para análise do tecido, e a

dermatoscopia pode ser utilizada para aumentar a precisão da amostragem (Nwafor *et al.*, 2023).

O exame histopatológico é considerado o método de referência padrão para o diagnóstico de melanoma. As características típicas de um melanoma incluem a organização das células melanocíticas em camadas e ninhos, além da presença ou ausência de invasões perineurais e quantidade de linfócitos infiltrantes do tumor (TILs), cuja presença pode indicar uma resposta imunológica ao melanoma (Nwafor *et al.*, 2023).

Considerando as discussões apresentadas, é fundamental destacar que o rastreamento precoce e a utilização de tecnologias como a dermatoscopia digital e a teledermatologia se mostram como recursos valiosos para a identificação precoce de lesões malignas. Contudo, apesar dos grandes avanços tanto no diagnóstico, como no tratamento, ainda existem desafios para diminuir a fadiga relacionada ao câncer e efeitos colaterais associados aos tratamentos. Por isto, estudos com modelos *in vitro* e *in vivo* são essenciais tanto para a descoberta de novos alvos terapêuticos, como para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes ou de uso complementar, capazes de melhorar o prognóstico e qualidade de vida do paciente oncológico.

2 Células de Melanoma B16F10

A linhagem celular de melanoma murino B16F10 é amplamente empregada na pesquisa devido à sua alta capacidade metastática, superior a outras linhagens. Desenvolvido por Fidler em 1973 a partir da linhagem B16, após aproximadamente dez passagens em modelos animais, a linhagem evoluiu para a B16F10, adquirindo uma capacidade metastática aumentada (Voltarelli *et al.*, 2017).

Células B16F10 são de fácil manejo e utilizadas amplamente em experimentos *in vitro* e *in vivo*, pelo seu crescimento eficiente em cultura e sua capacidade de formar tumores subcutâneos ou metástases pulmonares, dependendo do método de inoculação escolhido. Por isto, estas células são frequentemente empregadas como modelo experimental de melanoma metastático em camundongos, permitindo o estudo de vários aspectos do câncer, incluindo a imunoterapia e a metástase (Arimoto *et al.*, 2018, Sanches, 2014).

Além do motivo apresentado anteriormente, estas células possuem perfil genético específico, em geral, não apresentam mutações nos genes RAS e BRAF,

além de manterem a expressão da proteína PTEN e não apresentarem mutação no gene p53 (Voltarelli *et al.*, 2017). Essas características genéticas são importantes para entender a resistência ao tratamento, pois a ausência de mutações em genes frequentemente associados ao melanoma, como BRAF e RAS, pode indicar uma resposta distinta a terapias-alvo, diferenciando-se de outros tipos de melanoma (Pinto *et al.*, 2022).

A pesquisa com as células B16F10 continua a contribuir para o desenvolvimento de imunoterapias inovadoras, incluindo bloqueios de pontos de controle e vacinas imunológicas de neoantígenos, e é uma ferramenta vital para testar a eficácia de novas abordagens terapêuticas e entender mecanismos de resistência em terapias contra o melanoma metastático.

Assim, o conjunto destas características indicam que o uso da linhagem B16F10 é um modelo confiável para a análise de progressão tumoral, estudos de mecanismos de ação e avaliações da eficácia de terapias anticâncer em pesquisas básicas e pré-clínicas.

3 Homeopatia

O uso de ultradiluições dinamizadas introduzido por Samuel Hahnemann no século XVIII e popularizado no Brasil no século XIX, surgiu das suas observações com a *Cinchona officinalis* L., usada para tratar malária, a qual causava sintomas semelhantes aos da doença, em doses elevadas. Esse fenômeno levou Hahnemann a formular o princípio dos semelhantes no qual uma substância que causa certos sintomas em doses altas pode, em doses diluídas, tratar doenças com sintomas semelhantes. Esse princípio deu origem à homeopatia, uma abordagem terapêutica complementar e integrativa utilizada no tratamento de diversas doenças (Bonato 2014; Ullman 2021).

Além da diluição das substâncias para minimizar seus efeitos adversos, observações mostraram que essas diluições quando agitadas eram mais eficazes. Essa agitação, chamada de sucussão, possivelmente amplificava a ação farmacológica das soluções, especialmente durante viagens em que Hahnemann transportava as substâncias em carruagens sobre estradas acidentadas (Ullman, 2021). Assim, a dinamização de substâncias solúveis consiste em um método que combina diluições progressivas com agitações intensas (sucussão), partindo de uma

solução base e empregando um meio inerte adequado como veículo (Holandino *et al*, 2022).

De acordo com Sá e Santos (2014), as escalas homeopáticas são responsáveis por estabelecer a relação entre o insumo ativo e o insumo inerte nos medicamentos. As escalas mais comuns na prática farmacotécnica homeopática incluem a centesimal, a decimal e a cinquenta-milesimal. A escala centesimal (C), idealizada por Hahnemann e amplamente empregada no Brasil, utiliza uma parte de insumo ativo para 99 partes de insumo inerte, somando um total de 100 partes. A escala decimal (X), por sua vez, foi desenvolvida por Constantine Hering e promove a diluição de uma parte de insumo ativo em nove partes de inerte, totalizando dez partes. A escala cinquenta milesimal (LM), também criada por Hahnemann, é destinada à produção de potências muito elevadas, na proporção de 1/50.000. Inicialmente, Hahnemann e seus colegas limitavam o número de diluições a cerca de 30C, acreditando que diluições muito altas poderiam ser desnecessárias. Contudo, ao longo do tempo, mesmo as diluições elevadas como 1.000C, mostraram eficácia em tratamentos muitas vezes, com a vantagem de necessitarem menos repetições de doses (Upadhyay, 2020).

Esse fenômeno, embora inicialmente visto com ceticismo, levou ao uso do termo de ultradiluições, que são amplamente aceitas por milhões de praticantes e pacientes adeptos à homeopatia. A ultradiluição se aproxima do conceito de hormese, em que doses pequenas de substâncias tóxicas provocam uma reação benéfica do organismo, mas vai além, utilizando diluições muito mais altas (Ullman, 2021).

Dessa forma, as ultradiluições referem-se a preparações homeopáticas em que substâncias são diluídas em proporções extremas, muitas vezes além do ponto em que uma molécula da substância original pode estar presente. Estudos sugerem que essas diluições mantêm uma "atividade não material" que pode ter efeitos terapêuticos (Rajendran, 2023). De acordo com Waisse (2017), essas diluições são realizadas além do limite de Avogadro, onde praticamente nenhuma molécula da substância original permanece. Devido a essa extrema diluição, as ultradiluições desafiam a ciência tradicional que questiona a plausibilidade de qualquer efeito físico-químico ou biológico sem a presença molecular do princípio ativo.

Na preparação de medicamentos homeopáticos diferentes veículos são utilizados para diluir a substância ativa: água purificada ou etanol são usados para substâncias solúveis, enquanto a lactose é indicada para as insolúveis. Assim, a

metodologia para o preparo das dinamizações envolve, por exemplo para a escala centesimal, 1% de uma substância ativa a 99% de água ou etanol, seguido de uma agitação (sucussão) para criar uma potência de 1C. Potências mais altas são obtidas através de sucessivas diluições, processo proposto por Hahnemann e adotado no desenvolvimento de tratamentos homeopáticos (Bonato, 2014).

Apesar de controvérsias, evidências experimentais indicam que as ultradiluições podem interagir com o corpo humano de maneira única, possivelmente por meio da estrutura da água ou nanopartículas envolvidas nas diluições, desafiando a compreensão tradicional dos medicamentos convencionais (Rajendran, 2023). Por outro lado, a reprodutibilidade dos experimentos ainda é um desafio, com revisões sugerindo que efeitos positivos devem ser interpretados com cautela, dada a influência de variáveis incontornáveis e possíveis falsos positivos causados por artefatos experimentais. Esses fatores aumentam a complexidade de validação dos resultados (Teixeira e Carneiro, 2017).

Nos últimos anos, diversos estudos vêm investigando o uso de medicamentos homeopáticos como terapia complementar de primeira opção para pacientes oncológicos, com o objetivo de reduzir efeitos colaterais, otimizar respostas aos tratamentos convencionais, além de aumentar a qualidade de vida e sobrevida desses pacientes (Carvalho, Porto e Bonamin 2013, Remya e Kutan 2015, Bagot, Legrand e Theunissen 2021). Entre os medicamentos homeopáticos mais utilizados e estudados como terapia complementar na oncologia veterinária e humana é o *Viscum album* L homeopático (Carvalho, 2015; Bonamin; Waisse, 2019).

4 *Viscum album* L.

O *Viscum album* L. (Va), conhecido como visco, é um medicamento amplamente utilizado na medicina antroposófica, especialmente no tratamento de câncer, doenças crônicas que afetam sistemas múltiplos e hepatite C. Essa planta semiparasita se desenvolve em copas de árvores em ambientes arejados, o que a impede de se fixar diretamente no solo. Para seu crescimento, o Va depende completamente do hospedeiro, penetrando nos galhos da árvore por meio de pseudo-raízes até alcançar o câmbio vascular, de onde extrai água. Ela cresce em diversas árvores como: amoreira, pinheiro e carvalho, o que influencia em parte suas características físico-químicas (Chagas, 2022).

De acordo com Choi *et al.* (2022), trata-se de uma planta semiparasita da família *Viscaceae*, utilizada com fins medicinais em diferentes partes do mundo. Na Coreia, é conhecida por equilibrar o fígado e rins, fortalecer ossos e articulações, aliviar dores e prevenir aborto. Seu uso mais estudado é como terapia complementar no câncer, devido às propriedades de seus compostos como lectinas e viscotoxinas, que induzem apoptose de células tumorais e modulam o sistema imunológico, favorecendo a melhora da qualidade de vida do paciente oncológico (Paller *et al.*, 2023).

O processo para transformar o Va em medicamento contra o câncer, descrito por Rudolf Steiner, exigia colheitas da planta nas estações de verão e inverno, combinadas por meio de uma técnica inovadora para a época, com disco giratório a alta velocidade. Estudos desde os anos 1960 confirmaram a citotoxicidade do Va com ênfase nas lectinas e viscotoxinas, substâncias responsáveis por efeitos antineoplásicos distintos. A planta também é notável por concentrar minerais como potássio, cálcio e silício, além de compostos orgânicos como aminoácidos e polissacarídeos. Essa composição única varia sazonalmente, reforçando a eficácia do extrato combinado de verão e inverno. Apesar dos avanços, desafios persistem, como incorporar substâncias viscosas insolúveis em água aos preparados e explorar o impacto do silício no tratamento do câncer (Choi *et al.*, 2022).

No contexto das terapias oncológicas, o *Viscum album* L. pode ser classificado em quatro categorias, nomeadamente: terapia adjuvante, terapia de suporte, terapia paliativa e terapia profilática. A terapia adjuvante, em particular, tem como objetivo principal melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida dos pacientes, sendo frequentemente utilizada para prevenir a reincidência após tratamentos oncológicos (Wolff *et al.*, 2021).

A terapia de suporte é recomendada em conjunto com quimioterapia ou radioterapia, proporcionando maior imunoproteção. Em casos de câncer inoperável ou em fase metastática, a terapia paliativa é fundamental para melhorar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes. Por sua vez, a terapia profilática visa promover a involução de quadros pré-tumorais (Wolff *et al.*, 2021).

Os compostos biologicamente ativos dos extratos do Va demonstraram a capacidade de eliminar células tumorais em estudos *in vitro* e estimular o sistema imunológico em condições *in vivo*. Esses extratos são classificados como substâncias que promovem a resposta do organismo contra infecções e doenças, exercendo uma

ação protetora sobre o material genético (DNA) dos leucócitos, incluindo as células afetadas pela quimioterapia (Mansky *et al.*, 2013).

A administração do Va, seja por via subcutânea ou intravenosa, resulta na ligação da maioria das lectinas às glicoproteínas transmembrânicas evitando efeitos tóxicos. As viscotoxinas, por outro lado, interagem com a fosfatidilserina presente nas membranas celulares, alterando sua composição. Esse efeito é especialmente acentuado em células tumorais, que apresentam quantidades maiores de fosfatidilserina, tornando-as mais sensíveis à ação das viscotoxinas (Tsekouras *et al.*, 2020).

O Va está disponível em forma de extrato aquoso fresco e solução injetável com os nomes comerciais de Helixor e Iscador. Existem diferentes tipos de *Viscum album*, associados as diferentes árvores hospedeiras decíduas, incluindo *Malus domestica* Bork., *Quercus robur* L. e *Ulmus carpinifolia* Gled (Jäger *et al.*, 2021).

A indicação e a posologia são determinadas com base no histórico clínico do paciente, no tipo e na localização do tumor, bem como na presença de comorbidades e no tratamento oncológico em andamento, uma vez que cada árvore possui características particulares (Rodrigues e Mastroianni, 2020).

A eficácia do Va foi comprovada em diversas publicações. Estudos prospectivos, planejados, controlados e multicêntricos, demonstraram que sua associação com terapias oncológicas convencionais resulta em uma melhoria significativa na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes, além de reduzir os efeitos adversos dos quimioterápicos (Rodrigues e Mastroianni, 2020). Pesquisas como a de Yosri *et al.* (2024) destacam a importância de investigar o papel da planta como complemento aos tratamentos convencionais, especialmente em relação à melhoria da qualidade de vida de pacientes com câncer avançado.

O estudo de Biegel *et al.* (2022) revisou sistematicamente o uso de extratos de Va no tratamento de neoplasias em animais de companhia. Após análise de 6.148 referências, 61 estudos foram incluídos, abrangendo 193 experimentos *in vitro* e 67 *in vivo*. Tumores como melanomas, sarcomas e carcinomas mamários em cães, além de sarcoides equinos, mostraram maior resposta ao Va. No entanto, de acordo com os autores, a qualidade e quantidade limitadas de estudos dificultam conclusões definitivas, destacando a necessidade de mais pesquisas para validar a eficácia e mecanismos do Va em oncologia veterinária.

O estudo de Prado (2021) investigou os efeitos de Va no modelo do melanoma, utilizando ultradiluições provenientes de tinturas mães preparadas partir de amostras coletadas de árvores das subespécies *Abies alba* e *Quercus robur* na estação do verão, que mostraram alta citotoxicidade com diminuição do metabolismo celular, alterações morfológicas, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e citocinas inflamatórias. Em destaque, preparações homeopáticas nas potências 12X e 5LM mostraram modulação nos processos celulares, incluindo metabolismo, replicação, estresse oxidativo e inflamação. A diluição 200C causou citotoxicidade e aumentou os níveis de EROs. Esses dados inéditos oferecem novas perspectivas sobre os efeitos antineoplásicos das preparações homeopáticas de Va.

Contudo, apesar dos estudos apresentados acima sobre os efeitos imunomoduladores e antitumorais do Va, eles ainda geram debates na comunidade científica sobre sua eficácia e os mecanismos de ação envolvidos. Por isto, mais estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos de ação, verificar sua eficácia e segurança de forma conclusiva.

5 Óxido Nítrico e Câncer

No câncer, o óxido nítrico (NO) possui papel controverso com efeitos que podem ser tanto benéficos quanto prejudiciais, dependendo da sua concentração. Em níveis baixos, pode estimular a proliferação de células tumorais e promover angiogênese, favorecendo o crescimento e a metástase do tumor. Em concentrações mais altas, no entanto, o NO pode induzir apoptose das células cancerosas. Seu efeito depende da interação com proteínas como p53, que regula a morte celular, e sua modulação tem sido estudada em terapias, como a fototerapia dinâmica e imunoterapia (Sun *et al.*, 2023; Fang *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2023). Essa regulação sugere que o NO pode impulsionar a progressão do câncer em concentrações baixas e pode ser um agente terapêutico em níveis elevados (Cinelli *et al.*, 2020).

Estudos recentes mostram que o NO pode atuar como um indutor da morte celular imunogênica, o que fortalece a resposta imune antitumoral. Isso abre novas possibilidades para o uso de NO em imunoterapia, onde ele pode ajudar a gerar uma resposta imune mais eficaz contra o tumor. A utilização de NO também tem sido explorada na fototerapia dinâmica, onde ele pode melhorar a eficácia do tratamento

ao aliviar a hipóxia celular e reduzir os antioxidantes, como o glutathione, que prejudicam a ação da terapia (Huang *et al.*, 2023).

Hu *et al.* (2020) também exploram tratamentos baseados no NO, como a terapia gênica e o uso de doadores de NO, que promovem a apoptose, inibem metástases e aumentam a sensibilidade dos tumores à quimioterapia e imunoterapia. A combinação de NO com outros medicamentos anticâncer pode melhorar a eficácia do tratamento, enquanto novas estratégias, como o uso de nanopartículas e biopolímeros, oferecem formas mais direcionadas e controladas de liberar NO para tratamento de tumores.

No estudo de Ramirez-Patiño *et al.* (2022), sobre a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em modelos murinos foi utilizada como estratégia experimental para aumentar a produção de NO, observando-se uma redução significativa no tamanho do tumor, resistência à radiação e diminuição da metástase para o pulmão. Esta abordagem demonstrou que a manipulação da expressão de iNOS pode ter efeitos benéficos no controle do crescimento tumoral e na resistência ao tratamento em modelos experimentais de câncer.

A modulação dos níveis de NO oferece um potencial terapêutico significativo, seja em tratamentos com doadores de NO, seja em combinações com outras terapias como a imunoterapia e fototerapia dinâmica. Portanto, a compreensão desses mecanismos pode abrir portas para estratégias terapêuticas inovadoras e mais eficazes no tratamento do câncer.

Em conjunto, todas as informações aqui descritas mostram a necessidade de novos estudos para melhor compreensão dos efeitos de medicamentos ultradiluídos de *Viscum album* L., preparados a partir de tinturas mães distintas, obtidas de extratos alcoólicos de Va coletados de amostras de árvores hospedeiras diferentes nas estações de verão e inverno. Para isso, no presente trabalho o intuito foi avaliar a influência de ultradiluições de *Viscum album* L. (Va), preparadas com amostras coletadas da árvore hospedeira *Quercus rubor* na estação de verão, na capacidade de migração das células de melanoma murino B16F10. Além disso, os níveis de óxido nítrico nas células B16F10 foram verificados após tratamento com esses medicamentos para determinar possível participação no potencial migratório/invasivo dessas células. Em paralelo, o estudo da composição de colágeno em biopsias de tumores de animais previamente tratados com esses medicamentos, foi realizado para

determinar a arquitetura tecidual que possa favorecer a migração e consequentemente formação de metástases.

REFERÊNCIAS

ARIMOTO, Akira *et al.* Immunosuppression induced by perioperative peritonitis promotes lung metastasis. **Anticancer Research**, v. 38, n. 7, p. 4333-4338, 2018.

BAGOT, J. L.; LEGRAND, A.; THEUNISSEN, I. Use of Homeopathy in Integrative Oncology in Strasbourg, France: Multi-center Cross-Sectional Descriptive Study of Patients Undergoing Cancer Treatment. **Homeopathy**, 2021.

BIEGEL, U.; MEVISSSEN, M.; SCHULLER, S.; RUESS, K.; CHRISTEN, O.; AYRLE, H.; KOCH, C.; WALKENHORST, M. *Viscum album* L., a therapeutic option for neoplastic diseases in companion animals? A systematic review. **Complementary Medicine Research**, v. 29, n. 6, p. 465-482, 2022. DOI: 10.1159/000525035.

BONAMIN, L.; WAISSE S. Transdisciplinarity and Translationality in High Dilution Research: Signals and Images Giri Series. **Cambridge Scholars Publishing**, 2019.

BONATO, C. M. (coord). **Homeopatia Simples**: alternativa para agricultura familiar. Marechal Candido Rondon: Gráfica Escala, 4. ed. 50 p. 2014. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/400657123/Cartilha-Homeopatia-VersaoDiagramada-2014>.

BRAGA, Geórgia *et al.* Cutaneous melanoma and purinergic modulation by phenolic compounds. **Purinergic Signalling**, p. 1-13, 2024.

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM I.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024. doi: 10.3322/caac.21834. Epub 2024 Apr 4.

CARVALHO, A. C. **Atividade anti-neoplásica de *Viscum album* (L.) em tumores experimentais**: revisão crítica e estudo experimental em tumor de ehrlich. Tese de Doutorado. Universidade Paulista. 2015.

CARVALHO, A. C.; PORTO, E.; BONAMIN, L. V. Canine neurofibrosarcoma treatment with *Viscum album* in serial dilutions. **International Journal of High Dilution Research**, v. 12, n. 44, p. 106-106, 2013.

CHAGAS, Jaqueline Maria *et al.* The use of integrative oncological therapy as a supplement to conventional treatment for osteosarcoma. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 1, p. 2711-2719, 2022.

CHOI, Hye Jin *et al.* Selective Immune Modulating Activities of *Viscum album* and Its Components; A Possibility of Therapeutics on Skin Rash Induced by EGFR Inhibitors. **Integrative Cancer Therapies**, v. 21, p. 15347354221118332, 2022.

CINELLI, Maris A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal research reviews**, v. 40, n. 1, p. 158-189, 2020.

FANG, Xiao *et al.* Photogenerated holes mediated nitric oxide production for hypoxic tumor treatment. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 13, p. 7046-7050, 2021.

GARBE, Claus *et al.* Skin cancers are the most frequent cancers in fair-skinned populations, but we can prevent them. **European journal of cancer**, v. 204, p. 114074, 2024.

HOLANDINO, C.; LEAL, F. D.; BARCELLOS, B. de O.; CAMPOS, M. A.; OLIVEIRA, R.; VEIGA, V. F.; GARCIA, S.; ZACHARIAS, C. R. Mechanical versus manual succussion: a comparative study of the physical-chemical behavior of ultradiluted and dynamized solutions. **International Journal of High Dilution Research**, v. 6, n. 19, p. 31-32, 2022. DOI: 10.51910/ijhdr.v6i19.46.

HU, Ya *et al.* The regulation of nitric oxide in tumor progression and therapy. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 2, p. 0300060520905985, 2020.

HUANG, Yu *et al.* Nitric oxide and thyroid carcinoma: A review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 1050656, 2023.

JÄGER, T.; HOLANDINO, C.; MELO, M. N. O.; PEÑALOZA, E. M. C.; OLIVEIRA, A. P.; GARRETT, R.; GLAUSER, G.; GRAZI, M.; RAMM, H.; URECH, K.; BAUMGARTNER, S. Metabolomics by UHPLC-Q-TOF reveals host tree-dependent phytochemical variation in *Viscum album* L. **Plants** (Basel), v. 10, n. 8, p. 1726, 20 ago. 2021. DOI: 10.3390/plants10081726.

LAUTERS, Rebecca; BROWN, Ashley Dianne; HARRINGTON, Kari-Claudia Allen. Melanoma: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, v. 110, n. 4, p. 367-377, 2024.

MANSKY, Patrick J. *et al.* NCCAM/NCI phase 1 study of mistletoe extract and gemcitabine in patients with advanced solid tumors. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 964592, 2013.

MELO, M. N. O.; BATISTA, J. V. D. C.; PEÑALOZA, E. M. C.; OLIVEIRA, A. P.; GARRETT, R.; BAUMGARTNER, S.; HOLANDINO, C. A scoping review of genus *Viscum*: biological and chemical aspects of alcoholic extracts. **Plants** (Basel), v. 12, n. 9, p. 1811, 28 abr. 2023. DOI: 10.3390/plants12091811.

NWAFOR, Jane N. *et al.* The Role of Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Different Stages of Melanoma. **Cureus**, v. 15, n. 5, 2023.

PALLER, Channing J. *et al.* Phase I trial of intravenous mistletoe extract in advanced cancer. **Cancer Research Communications**, v. 3, n. 2, p. 338-346, 2023.

PINTO, Carolina Marques. **Mecanismos de resistência do melanoma metastático à quimioterapia e abordagem de novos alvos terapêuticos**. 2022. Dissertação

(Mestrado Integrado, Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2022.

PRADO, P. I. B. **Avaliação *in vitro* do efeito de preparações homeopáticas de *Viscum album* sobre células de melanoma murino**. 2021. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unip.br/wp-content/uploads/tainacan-items/212/85260/PRADO-P-I-B-do-P.pdf>.

RAIMONDI, Sara; SUPPA, Mariano; GANDINI, Sara. Melanoma epidemiology and sun exposure. **Acta dermato-venereologica**, v. 100, n. 11, 2020.

RAJENDRAN, E. S. Nanomaterial characterisation of diluted Platina and alcohol control samples. **Homeopathy**, v. 112, n. 03, p. 144-151, 2023.

RAMÍREZ-PATÍÑO, R. *et al.* Influence of nitric oxide signaling mechanisms in cancer. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 36, p. 03946320221135454, 2022.

RAYMOND-LEZMAN, Jonathan R.; RISKIN, Suzanne. Attitudes, behaviors, and risks of sun protection to prevent skin cancer amongst children, adolescents, and adults. **Cureus**, v. 15, n. 2, 2023.

REMYA, V., KUTTAN, G. Homeopathic remedies with antineoplastic properties have immunomodulatory effects in experimental animals. **Homeopathy**, v.104(3), p. 211-219, 2015.

RODRIGUES, Eliana; MASTROIANNI, Patrícia de Carvalho. **Produtos à base de plantas: efetividade e segurança no tratamento de pacientes oncológicos**. 2020.

SÁ, F., SANTOS, R. Homeopatia: histórico e fundamentos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 60–78, 2014. DOI:10.31072/rcf.v5i1.206.

SAEED, W.; SHAHBAZ, E.; MAQSOOD, Q.; ALI, S. W.; MAHNOOR, M. Cutaneous oncology: strategies for melanoma prevention, diagnosis, and therapy. **Cancer Control**, v. 31, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/10732748241274978>.

SANCHES, Larissa Juliani. **Avaliação do efeito citotóxico do citral sobre células de melanoma murino metastático B16F10**. 2014. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

SANTOS, Marcell *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023.

SAUD, Anoosha *et al.* Melanoma metastasis: What role does melanin play?. **Oncology Reports**, v. 48, n. 6, p. 217, 2022.

SERMAN, N.; VRANIC, S.; GLIBO, M.; SERMAN, L.; BUKVIC MOKOS, Z. Genetic risk factors in melanoma etiopathogenesis and the role of genetic counseling: A

concise review. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 5, p. 673-682, 16 set. 2022. DOI: 10.17305/bjbms.2021.7378.

SHREBERK-HASSIDIM, R.; OSTROWSKI, S. M.; FISHER, D. E. The complex interplay between nevi and melanoma: risk factors and precursors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 3541, 2023. DOI: 10.3390/ijms24043541.

SILVA, T. C. **Estudo dos efeitos *in vivo* de preparações homeopáticas de *Viscum album* no modelo de melanoma murino**. 2023. Tese (Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

SUN, Steven H. *et al.* Btk inhibition potentiates anti-pd-l1 treatment in murine melanoma: potential role for mdsc modulation in immunotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 72, n. 11, p. 3461-3474, 2023.

TEIXEIRA, Marcus Zulian; CARNEIRO, Solange M.T.P.G. Efeito de ultradiluições homeopáticas em plantas: revisão da literatura. **Revista de Homeopatia**, v. 80, n. 1/2, p. 113-132, 2017.

TOUSSI, A.; MANS, N.; WELBORN, J.; KIURU, M. Germline mutations predisposing to melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 47, p. 606–616, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cup.13689>.

TSEKOURAS, V.; MAVRIKOU, S.; VLACHAKIS, D. *et al.* Proteome analysis of leaf, stem and callus in *Viscum album* and identification of lectins and viscotoxins with bioactive properties. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, p. 167–178, 2020. DOI: 10.1007/s11240-020-01777-7.

ULLMAN, Dana. Exploring possible mechanisms of hormesis and homeopathy in the light of nanopharmacology and ultra-high dilutions. **Dose-Response**, v. 19, n. 2, p. 15593258211022983, 2021.

UPADHYAY, R. P. Earliest medicines evolved from dangerous environmental stressors to support life on a hostile earth: a nanoparticle and water-based evolutionary theory. **Water**, v. 11, p. 55-77, 2020.

VOLTARELLI, F.A.; FRAJACOMO, F.T.; PADILHA, C.S.; TESTA, M.T.J.; CELLA, P.S.; RIBEIRO, D.F.; de OLIVEIRA, D.X.; VERONEZ, L.C.; BISSON, G.S.; MOURA, F.A.; DEMINICE, R. Syngeneic B16F10 melanoma causes cachexia and impaired skeletal muscle strength and locomotor activity in mice. **Frontiers Physiology**, v. 8, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00715

WAISSE, Silvia. Efeito de ultradiluições homeopáticas em modelos *in vitro*: revisão da literatura. **Revista de Homeopatia**, v. 80, n. 1/2, p. 98-112, 2017.

WHO, World Health Organization. **Invisible numbers: the true extent of noncommunicable diseases and what to do about them**. World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240057661> Acesso em: 28 out. 2024.

WOLFF, C.; BRAGANHOLO, D. A.; SILVA, G. V. da; ROSA, J. C. da S.; FIDELIS, L. T. V.; GARCIA, L. L. de F.; TEIXEIRA, L. E. de M. M.; BIRRO, M. L. G.; TAMBONE, S. B.; OLIVEIRA, M. F. de. O trabalho multiprofissional nos cuidados paliativos: um diálogo entre a medicina funcional integrativa e a atenção psicológica. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 39, p. e9459, 27 dez. 2021.

YAMAUCHI, T.; SHANGRAW, S.; ZHAI, Z.; RAVINDRAN MENON, D.; BATTI, N.; DELLAVALLE, R. P.; FUJITA, M. Alcohol as a non-UV social-environmental risk factor for melanoma. **Cancers**, v. 14, p. 5010, 2022. DOI: 10.3390/cancers14205010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers14205010>.

YOSRI, Nermeen; KAMAL, Nurkhalida; MEDIANI, Ahmed; ABOUZID, Sameh; SWILLAM, Ahmed; SWILAM, Mahmoud; AYYAT, Ahmed M.; JANTAN, Ibrahim. Immunomodulatory activity and inhibitory effects of *Viscum album* on cancer cells, its safety profiles and recent nanotechnology development. **Planta Medica**, v. 90, n. 14, p. e3-e3, 2024. DOI: 10.1055/a-2423-9185.

ZOCCHI, Lamberto; LONTANO, Alberto; MERLI, Martina; DIKA, Emi; NAGORE, Eduardo; QUAGLINO, Pietro; PUIG, Susana; RIBERO, Simone. Familial melanoma and susceptibility genes: a review of the most common clinical and dermoscopic phenotypic aspect, associated malignancies and practical tips for management. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 16, p. 3760, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm10163760>.

III. ARTIGO – Periódico para submissão: Homeopathy

INFLUÊNCIA DE MEDICAMENTOS ULTRADILUIDOS DE *Viscum album* L. NA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

Cristiane Morais¹, Priscila Inhauser do Prado¹, Carla Holandino², José Guilherme Xavier¹, Leoni Villano Bonamin¹ e Elizabeth Cristina Perez Hurtado^{1*}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista São Paulo, Brasil.

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

*Autor correspondente:

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

Resumo

O extrato de *Viscum album* L. é utilizado há séculos para fins medicinais e recentemente como tratamento complementar do câncer. Estudos recentes do grupo utilizando ultradiluições de tinturas mães de *Viscum album* L. (Va), preparadas em diferentes escalas de diluição, mostraram efeitos na viabilidade, atividade metabólica, produção de citocinas inflamatórias e diminuição das manifestações clínicas relacionadas à fadiga do câncer em modelos *in vitro* e *in vivo* de melanoma murino. Entretanto os efeitos desses medicamentos na capacidade de migração das células de melanoma murino não foram avaliados. Assim, o intuito do presente projeto foi avaliar *in vitro*, o potencial de migração das células de melanoma B16F10 antes e após tratamento com ultradiluições de Va nas potências 12X, 200C e 5LM. Para isto, células B16F10 foram tratadas ou não por 24 horas com os veículos (água ultrapura, filtrada e dinamizada na potência a ser avaliada) ou com a tintura mãe de Va obtido da árvore hospedeira *Quercus robur*, no verão suíço (TM-VaQrV), ou com ultradiluições de TM-VaQrV, nas potências de 12X, 200C e 5LM para ensaios de migração (*wound healing*) e quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO), liberados no sobrenadante de cultura após cada tratamento, nos tempos de 24 e 48 horas. Em paralelo, análises quantitativas das fibras de colágeno presentes nas biópsias de tumores de camundongos com melanoma tratados ou não com esses medicamentos foram avaliadas utilizando a coloração de picrosirius. Resultados obtidos não mostraram diferenças significativas na capacidade de migração celular, das células B16F10 após tratamento com tintura mãe ou ultradiluições de Va. Em contraste, o tratamento com as potências 12X e 5LM levaram à diminuição significativa dos níveis de NO observados nas células tratadas somente com o veículo. Paralelamente, análises do percentual da área de fibras de colágeno presentes nos tumores de animais tratados com esses medicamentos também não revelaram diferenças significativas em relação aos tumores de animais não tratados. Em conjunto, estes dados sugerem que ultradiluições de TM-VaQrV não afetam a capacidade de migração das células B16F10 e nem o estroma do tumor formado por elas, entretanto induzem diminuição nos níveis de NO que pode estar associado ao comportamento menos agressivo de estas células. Contudo, mais estudos são necessários para melhor compreensão dos efeitos das ultradiluições 12X e 5LM na diminuição do potencial agressivo de células de melanoma B16F10.

Introdução

O melanoma é um câncer de distribuição global, com elevada letalidade e de difícil tratamento. Apesar dos avanços nas intervenções convencionais, como a cirurgia e a imunoterapia, muitos pacientes ainda enfrentam resistência aos tratamentos e graves efeitos colaterais, o que evidencia a necessidade de explorar novas abordagens terapêuticas (Braga *et al.*, 2024; Melo *et al.*, 2023).

Neste contexto, o estudo de medicamentos que possam complementar à terapia convencional para a melhora da qualidade de vida, com aumento da sobrevida dos pacientes oncológicos, torna-se urgente (Braga *et al.*, 2024; Melo *et al.*, 2023). Assim, o *Viscum album* L., uma planta com propriedades medicinais conhecidas, apresenta-se como uma possível opção devido à sua ação antitumoral e propriedades imunomoduladoras que podem influenciar diferentes processos celulares e moleculares (Mansky *et al.*, 2013; Paller *et al.*, 2023).

O *Viscum album* L. (Va), conhecido como visco, é um medicamento amplamente utilizado na medicina antroposófica, especialmente no tratamento de câncer, doenças crônicas que afetam sistemas múltiplos e hepatite C. Essa planta semiparasita se desenvolve em copas de árvores em ambientes arejados, o que a impede de se fixar diretamente no solo. Para seu crescimento, o Va depende completamente do hospedeiro, penetrando nos galhos da árvore por meio de pseudo-raízes até alcançar o câmbio vascular, de onde extrai água. Ela cresce em diversas árvores como: *Morus* spp., *Pinus* spp. e *Quercus* spp., o que influencia em parte suas características físico-químicas (Chagas, 2022).

A maioria de estudos relacionados a Va é como terapia complementar no câncer, devido às propriedades de seus compostos como lectinas e viscotoxinas, que induzem apoptose de células tumorais e modulam o sistema imunológico, favorecendo a melhora da qualidade de vida do paciente oncológico (Paller *et al.*, 2023). Por outro lado, estudos de Melo *et al.* (2018) identificaram a presença de compostos como: ácido cafeico, ácido clorogênico, sakuranetina e ligabulosídeo nas tinturas mães de Va que podem ser responsáveis pela redução do crescimento celular de forma dependente da dose sugerindo, portanto, o potencial uso na pesquisa farmacoterapêutica contra o câncer.

Já as pesquisas com ultradiluições homeopáticas de *Viscum album* L., têm despertado o interesse da comunidade científica por favorecer a melhora da qualidade

de vida dos pacientes oncológicos. Dessa forma, a investigação de como essas ultradiluições afetam o potencial de migração das células de melanoma pode contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação dessas preparações, e fornecer ferramentas na área de oncofarmacologia para a implementação de estratégias mais eficazes na prevenção e tratamento de cânceres altamente agressivos como o melanoma, visando a melhora na sobrevida e principalmente a qualidade de vida destes pacientes.

Para o preparo de medicamentos homeopáticos diferentes escalas de diluição são utilizadas, para estabelecer a relação entre o insumo ativo e o insumo inerte nos medicamentos. As escalas mais comuns na prática farmacotécnica homeopática incluem a centesimal, a decimal e a cinquenta-millesimal. A escala centesimal (C), idealizada por Hahnemann e amplamente empregada no Brasil, utiliza uma parte de insumo ativo para 99 partes de insumo inerte, somando um total de 100 partes. A escala decimal (X), por sua vez, foi desenvolvida por Constantine Hering e promove a diluição de uma parte de insumo ativo em nove partes de inerte, totalizando dez partes. A escala cinquenta milesimal (LM), também criada por Hahnemann, é destinada à produção de potências muito elevadas, na proporção de 1/50.000. Independente da escala utilizada, cada diluição é seguida de uma agitação (sucussão) para formar a potência 1C, 1X ou 1LM. Potências mais altas são obtidas através de sucessivas diluições com respectiva sucussão, processo proposto por Hahnemann e adotado no desenvolvimento de tratamentos homeopáticos (Bonato, 2014).

A eficácia do Va foi comprovada em diversas publicações. Biegel *et al.* (2022) revisaram sistematicamente o uso de extratos de Va no tratamento de neoplasias em animais de companhia. Após análise de 6.148 referências, 61 estudos foram incluídos, abrangendo 193 experimentos *in vitro* e 67 *in vivo*. Tumores como melanomas, sarcomas e carcinomas mamários em cães, além de sarcoides equinos, mostraram maior resposta ao Va. No entanto, de acordo com os autores, a qualidade e quantidade limitadas de estudos dificultam conclusões definitivas, destacando a necessidade de mais pesquisas para validar a eficácia e mecanismos do Va em oncologia veterinária.

Estudos recentes do grupo, avaliaram no modelo de melanoma murino, os efeitos *in vivo* e *in vitro* de ultradiluições de Va preparadas a partir de tinturas mães de Va, obtidos de plantas colhidas das árvores hospedeiras de *Quercus robur* (TM Qr)

e *Abies alba* (TM Aa) nas estações de verão e inverno da Suíça. Resultados obtidos nestes estudos mostraram diminuição de mediadores inflamatórios e melhora notável da qualidade de vida de animais com melanoma, após o tratamento com as potências 12X, 200C e 5LM de TM-Qr na estação de verão (Prado, 2021; Silva, 2023). Entretanto, os efeitos destes medicamentos na capacidade de migração/metastatização de células B16F10 não foi avaliada.

Uma vez que a formação de metástase impacta na qualidade de vida do paciente oncológico, a avaliação dos efeitos de preparações ultradiluídas de *Viscum album* L. na capacidade de metastatização das células de melanoma murino pode contribuir para uma melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares induzidos pelo tratamento com esses medicamentos.

Material e métodos

Medicamentos e veículos

Tintura mãe (TM) proveniente de extrato alcoólico de *Viscum album* L. (Va) obtido da planta inteira coletado da árvore hospedeira *Quercus rubor* (TM Quercus) na estação de verão na Suíça, foi preparada conforme a farmacopeia homeopática brasileira pela Profa. Dra. Carla Holandino da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), que disponibilizou gentilmente uma alíquota para o presente estudo (Melo *et al.*, 2023). A TM Quercus foi encaminhada para a farmácia homeopática HN Cristiano, em São Paulo, para a obtenção das ultradiluições homeopáticas nas potências 12X, 200C e 5LM de acordo com a escala Hahnemanniana. Como veículo, água ultrapura, filtrada, diluída e sucussionada na potência respectiva foi usada e, a Carboplatina (B-platin – Blausiegel®) na concentração de 10% como quimioterápico.

Cultura celular

A linhagem de células de melanoma murino B16F10 obtida do banco de células do Rio Janeiro (BCRJ) foi cultivada em meio completo (R10) contendo: RPMI – 1640 (Gibco – Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco – Thermo Fisher Scientific), 1% antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco – Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

As células foram mantidas em garrafas de cultura, em incubadora (Thermo Fisher) a 37°C com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. Para coleta, as células foram submetidas a breve exposição à tripsina (Thermo Fisher) e inativação com meio R10.

Para os ensaios, as células foram semeadas em placas de 12 poços na concentração celular padronizada em 5x10⁴ células por poço, e incubadas *overnight* para total adesão das células e para posterior início dos tratamentos

Viabilidade celular pelo método de exclusão *Trypan blue*

Para contagem e determinação da viabilidade celular antes dos ensaios, foi utilizado o método de exclusão por *Trypan blue*. Para isso, 10 µL da suspensão celular foram adicionados a 10 µL do corante azul de tripan (diluição 1:1), após homogeneização, 10 µL desta solução foram colocados na câmara de Neubauer para quantificação das células vivas (não coradas) e mortas (coradas). Por este método, a células mortas adquirem a cor azul ao perderem a integridade da membrana celular o que permite a entrada do corante, ao passo que as células viáveis se apresentaram brilhantes e sem cor uma vez que a integridade da membrana não permite a entrada do corante. Para a realização dos ensaios, culturas celulares somente com viabilidade acima de 90% foram utilizadas.

Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular *Wound Healing* (WH) foi realizado para avaliar a influência dos tratamentos homeopáticos de *Viscum album* L. na migração das células B16F10. Para isto, células foram cultivadas em placas de 12 poços, e após adesão *overnight*, o meio foi substituído por meio sem soro e incubadas por 12 horas nas mesmas condições para sincronização do ciclo celular (*starvation*). Após este período de *starvation*, foi realizada uma linha constante ("ferida") em cada poço, com ajuda de uma ponteira de 1000 µL ao pressionar delicadamente contra o assoalho do poço da placa, provocando descontinuidade da monocamada celular. Imediatamente, células não aderidas foram retiradas por lavagem sucessivas com RPMI (aproximadamente 5 vezes). Em seguida, células B16F10 aderidas foram mantidas em cultura por 24h contendo só meio R10 novo (B16F10) ou meio R10 contendo 10% de Carboplatina ou 10% de TM Quercus, ou 10% de cada uma das ultradiluições de TM Quercus nas potências de 12X (Va 12X), 200C (Va 200C), e 5LM (Va 5LM). Cada poço com fenda

nas diferentes condições de cultura foi fotografado, através de microscópio utilizando lente objetiva de 10X, logo após às lavagens (tempo 0) e nos intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12, 22 e 24 horas de início do tratamento a fim de determinar o tamanho da “ferida” como indicativo de migração. As imagens foram avaliadas com o auxílio de programa de análises de imagem (ImageJ) para determinar a distância entre as duas margens de células formadas no poço após “ferida”. O ensaio de WH foi realizado em 3 momentos independentes (triplicata biológica) utilizando quadruplicata experimental (4 poços por amostra) para cada condição de tratamento.

Determinação de Óxido Nítrico

Para análises de produção de óxido nítrico (NO), células B16F10 foram cultivadas em placas de 12 poços na concentração de 5×10^4 células/poço, em quadruplicatas para cada condição experimental. Após 24 e 48 horas de cultura, 100 μ L de sobrenadante de cada quadruplicata experimental foram coletados, centrifugados para descarte de debris celulares e, imediatamente congelados em freezer -80°C até o momento do processamento. Pools de cada quadruplicata experimental obtidas em três experimentos independentes foram submetidas para análises.

As concentrações de NO_2 (nitrito), como estimativa da produção de NO foram determinadas por quimiluminescência, utilizando o equipamento Nitric Oxide Analyzer (Sievers, Modelo 280i), com limite de detecção para amostras líquidas de $\sim 1,0 \mu\text{M}$. Para isto, um volume de 10 μ L de cada um dos três pools, em cada condição experimental foi injetado três vezes ao frasco externo do equipamento, contendo ácido acético e iodeto de sódio 0,1 mM sob atmosfera inerte com gás nitrogênio (N_2). Para calibração e cálculo das concentrações, área do sinal dado pelo equipamento foi expresso em μM , utilizando como referência curva de calibração de nitrito de sódio na faixa de concentração entre 0,25 μM a 50 μM . Níveis de NO detectados foram corrigidos pela subtração dos valores de NO da amostra branco, representada por poços contendo somente meio de cultura (sem células), mantidos no mesmo tempo e condições que os poços com células foram cultivados.

Quantificação de colágeno pelo método de Picrosirius

Para avaliação do estroma tumoral após tratamento com ultradiluições de Va,

a coloração de picrosírius foi utilizada em amostras de biopsias doadas (ANEXO 1 e 2) de estudo anterior do grupo (SILVA *et al.*, 2023) utilizando camundongos com melanoma tratados com Carboplatina, álcool, TM Quercus ou suas ultradiluições 12X, 200C ou 5LM. Conforme relatado por Silva (2023), a tintura-mãe disponibilizada pela Farmácia HN Cristiano com 50% de álcool, foi sempre preparada no dia dos tratamentos, utilizando uma proporção de 1:5 (TM/Água ultrapura estéril), visando alcançar uma concentração final de 10% de álcool, a fim de reduzir possíveis efeitos tóxicos nos animais. Os medicamentos ultradiluídos 12X, 200C e 5LM e o veículo alcoólico (álcool 30%) foram produzidos na mesma farmácia, a partir de amostras de TM Quercus. Para a administração nos animais, tanto o veículo quanto os medicamentos ultradiluídos foram preparados em água estéril na proporção de 1:3 (Álcool/Água ultrapura ou Ultradiluição/Água ultrapura), para atingir a concentração final de álcool de 10% de álcool, conforme descrito também no preparo do tratamento com TM Quercus, com objetivo de minimizar sua toxicidade.

A técnica de picrosírius permite a análise quantitativa das fibras de colágeno, que apresentam diferentes tonalidades quando observados sob a luz polarizada. Para isto, o corante Picrosírius foi preparado com 0,5 g de Sírius Red adicionado de 500 mL de solução saturada de ácido pícrico. Para a coloração, as lâminas de biopsias foram desparafinadas, hidratadas e lavadas com água destilada por um minuto, coradas durante uma hora na solução de picrosírius red 0,1% e então lavadas em água corrente por cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina durante cinco minutos, lavadas por dez minutos em água corrente, desidratadas e clarificadas.

As lâminas foram observadas no microscópio Olympus BX60 com o auxílio de uma lente polarizada. Três imagens de cada um dos sete grupos avaliados, foram capturadas por uma câmera Nikon DS-Ri1 através do programa Nis Elements F4.00.00. Para análises, fotomicrografias adquiridas sem o uso da lente polarizada foram analisadas usando o *software* ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). As imagens analisadas foram obtidas a partir de uma região específica da lâmina, o centro do tumor, utilizando objetiva de 40x para garantir maior detalhamento. Em seguida, foi aplicada a ferramenta *Analyze Particles* para quantificação de área. Para padronização, os mesmos parâmetros de limiar e ajustes foram aplicados a todas as amostras. Os dados obtidos foram posteriormente exportados para análise

estatística

Análise estatística

Os testes de Normalidade (Shapiro-Wilk) e Homocedasticidade (Levene) foram aplicados para verificar se as distribuições das amostras eram ou não paramétricas. Após verificação, o teste ANOVA de uma ou duas vias com o pós-teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Análises e gráficos foram realizados usando Prism GraphPad 8 *Software* (Califórnia, USA). Diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas com $\alpha = 0,05$.

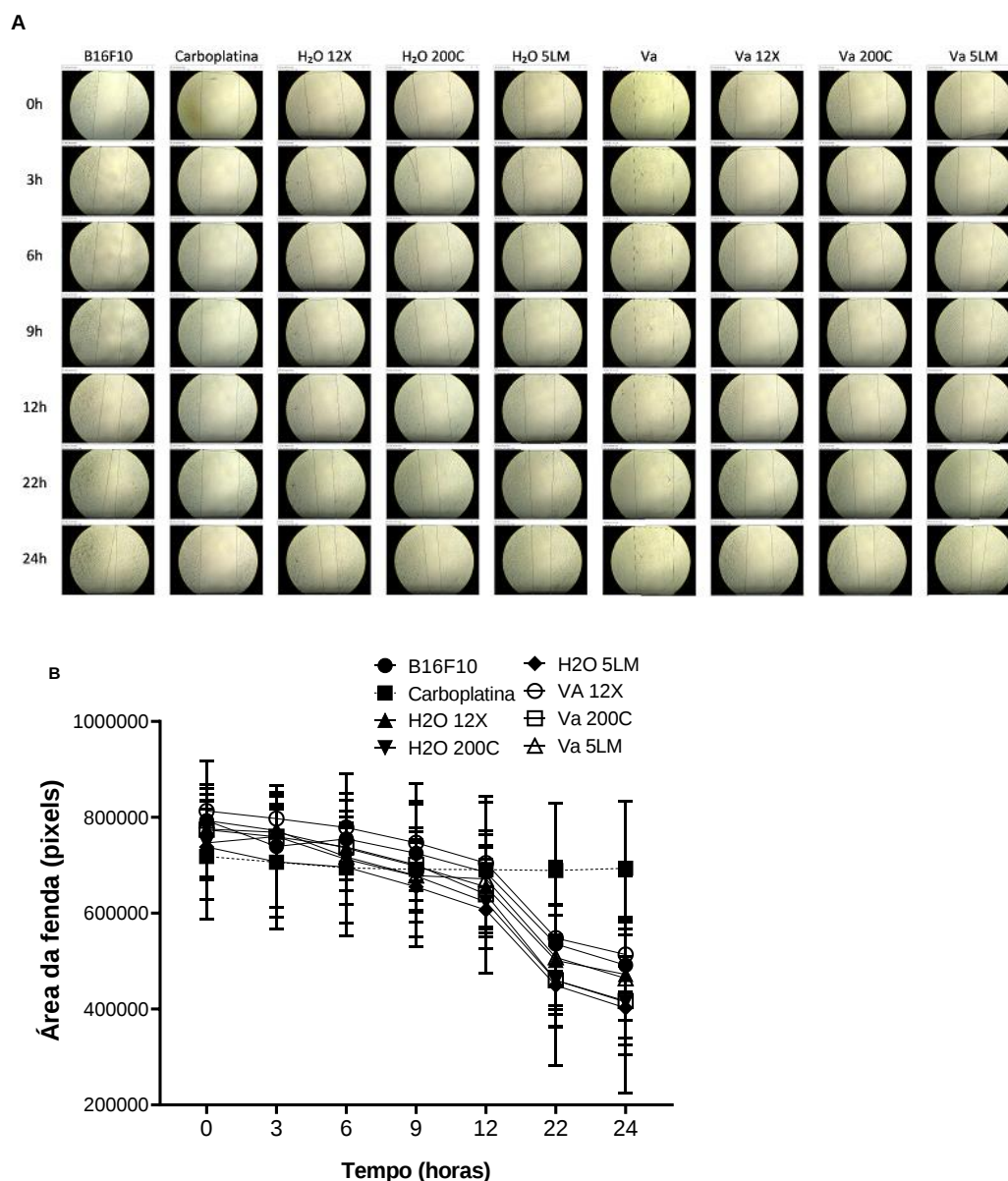
RESULTADOS

Ensaio de migração celular

A capacidade de migração das células B16F10 foi avaliada por meio da mensuração da área da ferida criada na monocamada celular (**Fig. 1A**). As análises foram realizadas em tempos diferentes, permitindo verificar a dinâmica de migração celular sob diferentes condições de tratamento (**Fig. 1B**). Fotomicrografias e lentes objetivas de 10X, análises apresentadas na **Fig. 1** e **Tabela 1**, **respectivamente** mostram que células tratadas com a potência de Va 5LM e o veículo H₂O 5LM apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na média das áreas das feridas nos tempos 22 horas (** $p = 0,0026$; **** $p < 0,0001$; respectivamente) e 24 horas (** $p = 0,0010$; **** $p < 0,0001$; respectivamente) em comparação ao tempo inicial (0 horas). Já os grupos H₂O 12X, H₂O 200C, Va 12X, Va 200C apresentaram diferença significativa nos tempos 12 horas (* $p = 0,0175$; ** $p = 0,0054$; ** $p = 0,0021$; ** $p = 0,0026$; respectivamente), 22 horas (**** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$; respectivamente) e 24 horas (**** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$; respectivamente) em relação ao tempo 0 horas. O grupo tratado com Carboplatina não apresentou diferença significativa em nenhum dos tempos avaliados em comparação ao tempo 0 horas ($p > 0,9984$). O grupo tratado com TM teve o tempo 0 horas registrado, porém apresentou morte celular de 100% já no tempo de 3 horas e por isso não foi possível determinar a área

da ferida nos outros tempos, conforme mostrado nas micrografias respectivas de cada tempo (**Fig. 1A**, coluna 6).

Dessa forma, conforme mostrado na **Tabela 1**, com exceção do grupo tratado com Carboplatina ($p = 0,9994$), todos os demais tratamentos demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre médias das áreas registradas entre os tempos 0 e 24 horas. Assim, estes resultados sugerem que as ultradiluições de Va, diferentemente ao quimioterápico Carboplatina, não impedem a capacidade de migração das células B16F10 (**Tabela 1**).



Fonte: Própria.

Fig. 1 Avaliação da migração das células B16F10 após tratamentos com ultradiluições de Viscum album L. em diferentes tempos. (A) Fotomicrografias utilizando lentes objetivas de 10X e (B) representação gráfica da área em pixels da fenda na monocamada de células B16F10 cultivadas em meio completo (B16F10); tratadas com 10% de Carboplatina (Carboplatina); ou com os veículos de água ultrapura filtrada dinamizada nas potências 12 decimal (H_2O 12X), 200 centesimal (H_2O 200C), ou 5 cinquenta-millesimal (H_2O 5LM); ou com ultradiluições de Viscum album L. (Va) preparadas a partir da tintura mãe de Quercus rubor (TM Quercus) nas potências 12X (Va 12X), 200C (Va 200C) e 5LM (Va 5LM), nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 22 e 24 horas. Colunas representam às médias de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata ou triplicata experimental ($n = 11$). ANOVA de duas vias com o pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, onde * representa tempos com diferença estatística ($p < 0,5$) em relação ao tempo inicial de 0h.

Tabela 1

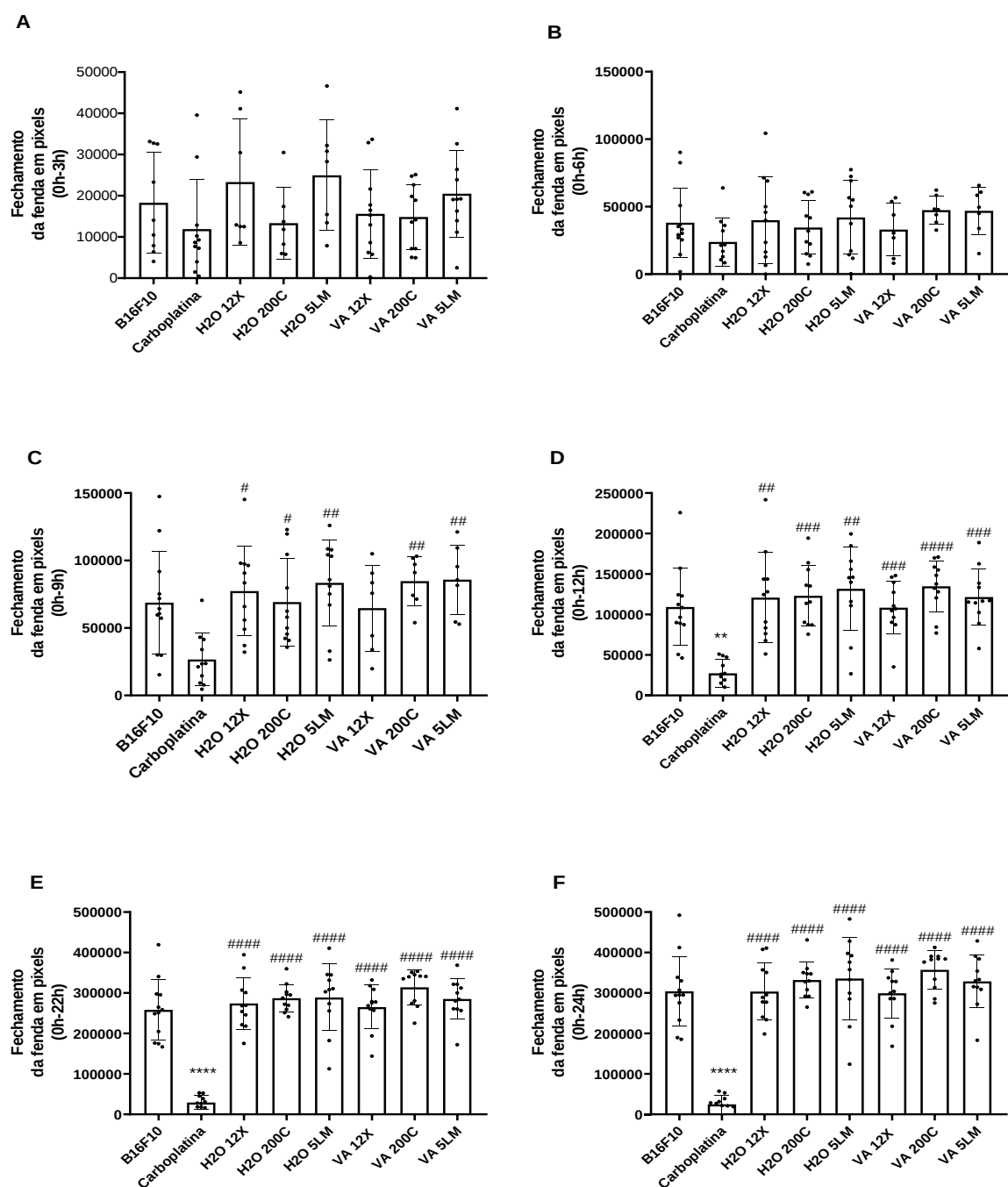
GRUPO	0h VS. 3h	0h VS. 6h	0h VS. 9h	0h VS. 12h	0h VS. 22h	0h VS. 24h
B16F10	ns	ns	ns	ns	*	**
					0,0117	0,0050
Carboplatina	ns	ns	ns	ns	ns	ns
H₂O 12X	ns	ns	ns	*	****	****
				0,0175	< 0,0001	< 0,0001
H₂O 200C	ns	ns	ns	**	****	****
				0,0054	< 0,0001	< 0,0001
H₂O 5LM	ns	ns	ns	ns	**	***
					0,0026	0,0010
Va 12X	ns	ns	ns	**	****	****
				0,0021	< 0,0001	< 0,0001
Va 200C	ns	ns	ns	**	****	****
				0,0026	< 0,0001	< 0,0001
Va 5LM	ns	ns	ns	ns	****	****
					< 0,0001	< 0,0001

Fonte: Própria.

Tabela 1 Valores de significância dos ensaios de *Wound healing*. Valores de p obtidos nas análises estatísticas usando ANOVA de duas vias com o pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, onde * representa significância do tempo avaliado (3, 6, 9, 12, 22 ou 24 horas) em relação ao grupo respectivo no tempo inicial 0h (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001) ou, ns não significativa.

Com o intuito de evidenciar a migração/crescimento das células B16F10 para a área da fenda após cada tratamento, ao longo dos tempos avaliados, a diferença ou delta (Δ) entre a área da ferida no tempo inicial (0h) e a área no tempo respectivo 3h (**Fig. 2A**), 6h (**Fig. 2B**), 9h (**Fig. 2C**), 12h (**Fig. 2D**), 22h (**Fig. 2E**) ou 24h (**Fig. 2F**) foi calculada (**Fig. 2**). Análise do delta das medidas das áreas entre os grupos, em cada condição e tempos avaliados demonstra que, em relação ao grupo controle B16F10, apenas o grupo Carboplatina apresenta diferença significativa nos tempos 12, 22 e 24 horas (** p = 0,0031; **** p < 0,0001; **** p < 0,0001; respectivamente). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle B16F10 em nenhum tempo avaliado. Já análises do delta dos grupos experimentais em relação ao grupo Carboplatina, nos diferentes tempos mostram que os grupos H₂O 12X, H₂O 200C, H₂O 5LM, Va 200C e Va 5LM apresentaram diferenças significativas

no tempo de 9h (* p = 0,0265; * p = 0,0409; ** p = 0,0090; ** p = 0,0020; ** p = 0,0025: respectivamente); No tempo 12 horas, os grupos H₂O 12X, H₂O 200C, H₂O 5LM, Va 12X, Va 200C e Va 5LM apresentaram diferença significativa (** p = 0,0072; *** p = 0,0005; ** p = 0,0010; *** p = 0,0005; **** p < 0,0001; *** p = 0,0001: respectivamente); No tempo 22 horas, os grupos H₂O 12X, H₂O 200C, H₂O 5LM, Va 12X, Va 200C e Va 5LM apresentaram diferença significativa (**** p < 0,0001); No tempo 24 horas, os grupos H₂O 12X, H₂O 200C, H₂O 5LM, Va 12X, Va 200C e Va 5LM apresentaram diferença significativa (**** p < 0,0001).



Fonte: Própria.

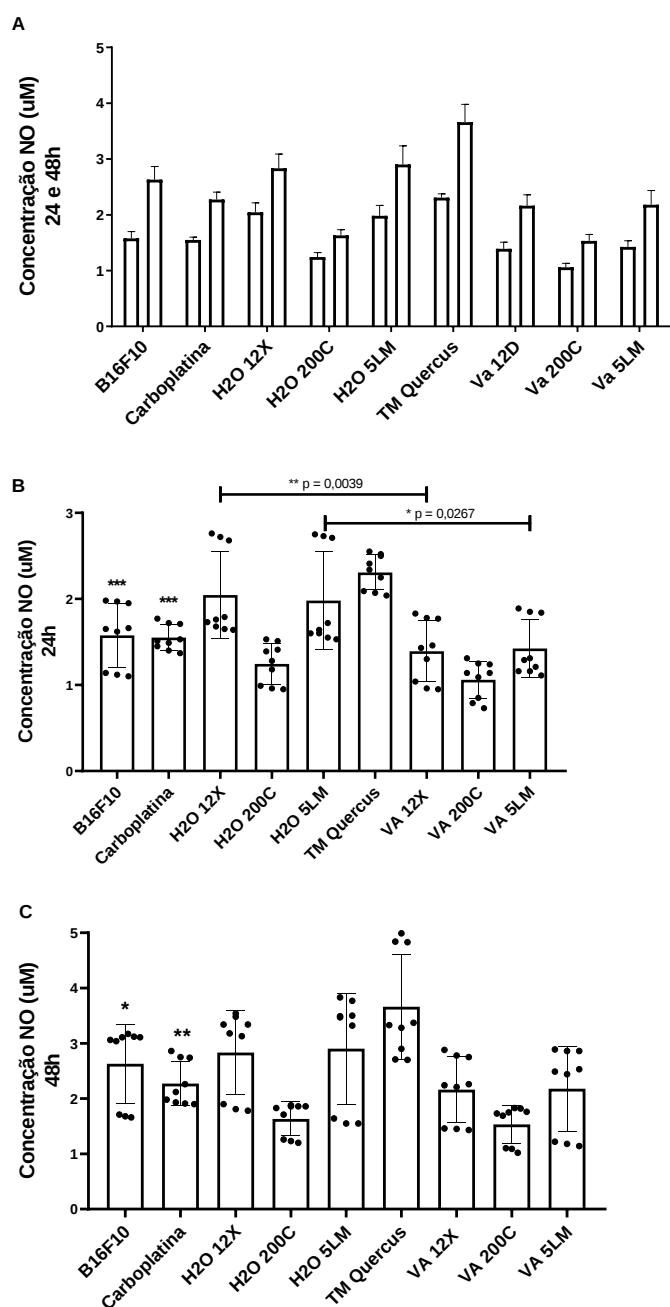
Fig. 2 Representação gráfica da diferença entre as medidas da área da fenda na monocamada no tempo inicial (0h) e os tempos de 3h (A), 6h (B), 9h (C), 12h (D), 22h (E) ou 24h (F). Colunas representam os valores médios dos deltas em cada tratamento obtidos em 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata ou triplicata experimental (n = 11). ANOVA de uma via com o pós-teste de Tukey, onde * representa significância em relação ao grupo B16F10 (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,00$) e # representa significância em relação ao grupo Carboplatina (# $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,00$).

Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico

Análises dos níveis de óxido nítrico (NO) foram determinadas após cada tratamento nos tempos de 24h e 48h (**Fig. 3A**).

Conforme observado na **Fig. 3A, 3B**, análises dos níveis de NO em 24 horas (**Fig. 3A**) demonstram aumento significativo no grupo TM Quercus em relação aos grupos B16F10 e Carboplatina ($*** p = 0,0007$; $*** p = 0,0004$; respectivamente, **Fig.3B**). Considerando as ultradiluições em relação aos seus respectivos veículos, as potências Va 12X ($** p = 0,0039$) e Va 5LM ($* p = 0,0267$) apresentaram diminuição significativa nos níveis de NO quando comparados aqueles produzidos pelos seus veículos H₂O 12X e H₂O 5LM, respectivamente.

Análises dos níveis de NO nas diferentes condições experimentais no tempo de 48h (**Fig. 3A, 3C**) demonstraram aumento significativo no grupo TM Quercus comparado aos grupos B16F10 e Carboplatina ($* p = 0,0241$; $** p = 0,0011$; respectivamente). Em relação às ultradiluições Va 12X, Va 200C e Va 5LM, análises não revelaram diferenças significativas entre elas e seus respectivos veículos H₂O 12X, H₂O 200C, H₂O 5LM ($p = 0,4992$; $p > 0,9999$; $p = 0,3900$; respectivamente).

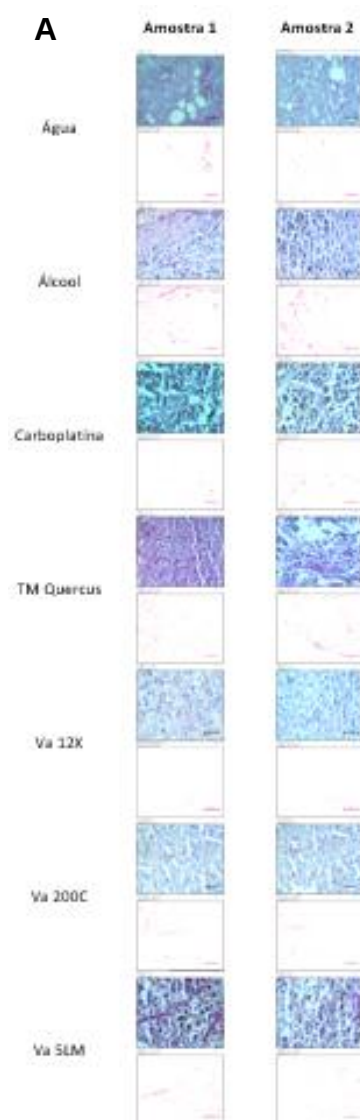


Fonte: Própria.

Fig.3 Colunas representas os valores médios em µM, das concentrações de óxido nítrico (NO) nas células B16F10 após cada condição experimental nos tempos de 24h (A e B) e 48h (A e C). Dados obtidos em 3 experimentos independentes cada uma proveniente de pool de amostras com 11 replicatas experimentais. ANOVA de uma via com o pós-teste de Tukey, onde * representa significância em relação ao grupo H₂O 12X comparado ao Va 12X (** p = 0,0039); e H₂O 5LM comparado ao Va 5LM (* p = 0,0267).

Coloração de picrosirius

Fotomicrografias representativas da região central do tecido tumoral, associadas às imagens destaque das fibras de colágenas coradas em tons róseos, após coloração de picrosirius, e adquiridas com luz não polarizada estão apresentadas na **Fig. 4A**. Análise do percentual da área ocupada por fibras de colágeno nas lâminas coradas com picrosirius (**Fig. 4B**) demonstraram diminuição significativa dessas fibras no grupo Carboplatina comparado ao grupo tratado com o veículo álcool (* $p = 0,0276$).



Fonte: Própria

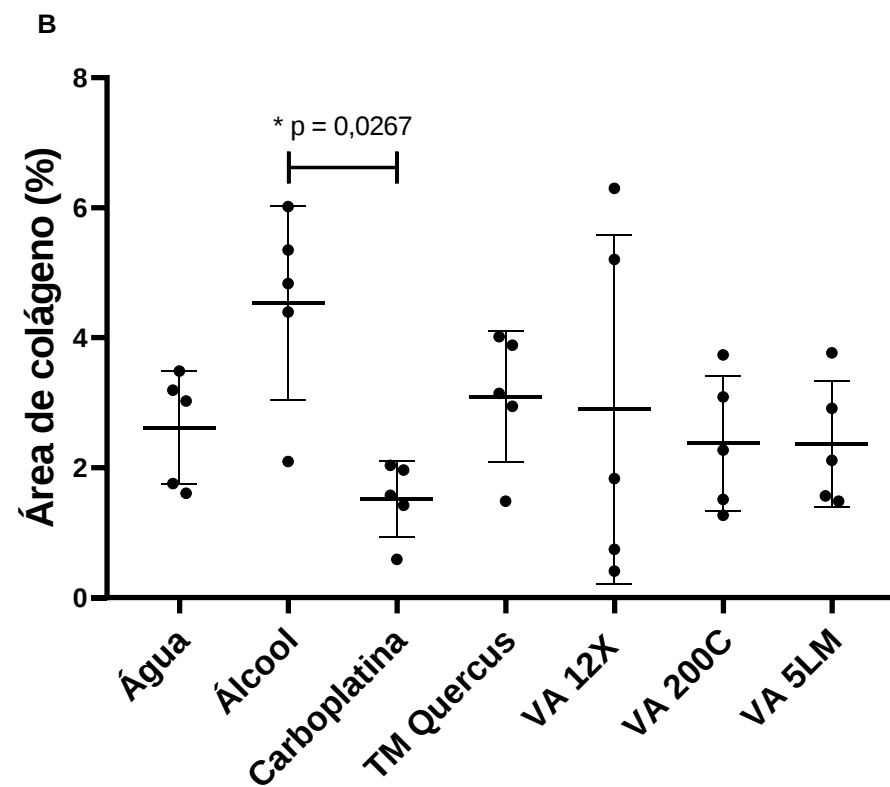


Fig. 4 (A) Fotomicrografias utilizando lentes objetivas de 40X representativas de biopsia de melanoma de cinco animais em cada condição experimental após coloração com Picrosirius, adquiridas com luz não polarizadas ou com o software ImageJ para destaque das fibras de colágeno. (B) Representação gráfica em colunas, das médias do percentual da área das fibras de colágeno presentes em cada condição experimental, obtidas no programa de análises ImageJ. Teste estadístico ANOVA de uma via com o pós-teste de Tukey, onde * representa significância em relação ao grupo Álcool (* p = 0,0267).

DISCUSSÃO

O uso de preparações de *Viscum album* (Va), conhecido também como *mistletoe*, na terapia integrativa em pacientes oncológicos é bem conhecido tanto na medicina veterinária como na humana (Thronicke *et al.*, 2022; Biegel *et al.*, 2022; Shin *et al.*, 2023; Schad *et al.*, 2023). Em geral, os medicamentos de Va disponibilizados comercialmente e as pesquisas em andamento focam no uso principalmente de extratos aquosos, sendo ainda incipientes os estudos com extratos de origem etanólica, e mais ainda preparados com doses ultradiluídas.

Com o intuito de determinar a composição química e os efeitos de extratos etanólicos de Va preparados com plantas coletadas de espécies de árvores diferentes, nas estações de verão e inverno suíço, Holandino e colaboradores demonstraram em diferentes linhagens celulares o potencial efeito antitumoral destes extratos (Holandino *et al.*, 2020; Melo *et al.*, 2022; Rocha *et al.*, 2022; Jäger *et al.*, 2022; Melo, *et al.*, 2023; de Almeida *et al.*, 2023). Entretanto, os efeitos de preparações ultradiluídas destes extratos não foram avaliados.

Uma vez que estudos de *Viscum album* ultradiluído na oncologia veterinária são escassos, trabalhos recentes do grupo de Onco-Homeopatia da UNIP, realizados com células de melanoma murino B16F10 em modelos *in vitro* e *in vivo*, evidenciaram efeitos contrastantes em relação ao metabolismo celular, produção de mediadores inflamatórios e nas manifestações clínicas de camundongos tratados com preparações ultradiluídas de Va em escalas de diluição diferentes (do Prado, 2021; Silva, 2023). Assim, resultados obtidos no modelo *in vivo*, mostraram que animais tratados com as ultradiluições de tintura mãe de Va preparada a partir de extratos etanólicos de Va provenientes da árvore hospedeira *Quercus rubor* no verão suíço, nas potências Va 12X e Va 5LM, apresentaram menos manifestações clínicas de

sofrimento/dor, com melhora evidente da disposição e do estado geral dos animais (Silva, 2023). Esses resultados levaram à hipótese de que tais ultradiluições poderiam estar modulando a capacidade metastática dessas células tumorais e influenciando processos biológicos associados à progressão da doença.

As metástases são uma das consequências mais graves da progressão tumoral, estando diretamente relacionadas ao agravamento do quadro clínico de pacientes com câncer (Nwafor *et al.* 2023). Por isto, a descoberta de medicamentos que possam interferir ou diminuir a capacidade de formação de metástases no câncer é de alta relevância para estabelecer protocolos mais eficientes para o tratamento da doença.

Dessa forma, a avaliação do efeito das ultradiluições de Va em relação à migração celular poderia prover dados relevantes que forneçam ferramentas para a compreensão dos mecanismos de ação das preparações homeopáticas de Va na progressão tumoral. Para melhor verificar os efeitos desses medicamentos diretamente na capacidade de migração das células de melanoma murino, foi usado o ensaio de *Wound Healing* (WH), que permite avaliar a migração celular nas primeiras horas (aproximadamente 12h) após diferentes condições experimentais.

Análises da área da fenda realizada durante o ensaio de WH entre os tratamentos, indicaram redução progressiva dessa área ao longo do tempo, nos grupos tratados com ultradiluições de Va, independentemente da escala de diluição. Esta redução nas medidas da área do WH, sugere fortemente que as ultradiluições de Va não afetam a capacidade nata de migração das células B16F10, característica associada com o alto potencial dessas células para invadir e colonizar outros órgãos para formar metástases (Justus *et al.*, 2014). Infelizmente, não foi possível concluir os efeitos na capacidade de migração de células B16F10 após o tratamento com tintura mãe de Va. Como mostrado previamente em experimentos do grupo (Prado, 2021) e confirmados mais uma vez no presente trabalho, a atividade citotóxica deste tratamento acontece logo na primeira hora de exposição, portanto não é possível avaliar esta característica neste grupo com o ensaio de WH.

Dados da literatura têm demonstrado as propriedades imunomoduladoras, citotóxicas, de inibição da migração e invasão celular de extratos de Va. Estas propriedades podem estar associadas à presença de viscotoxinas e lectinas, como elementos cruciais para os efeitos antineoplásicos dos extratos de Va, que contribuem

em grande parte, na redução da progressão tumoral, incluindo a metástase (Beermann *et al.*, 2024).

Em contraste, e como esperado, células de melanoma tratadas com carboplatina, apresentaram redução significativa da capacidade de migração dessas células tumorais, já nas primeiras horas pós-tratamento.

A carboplatina é amplamente utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer e foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) na década de 1980. Este agente quimioterápico atua promovendo lesões no DNA das células tumorais o que inibe a replicação e a transcrição, resultando na morte celular. No entanto, seu uso é limitado pelo desenvolvimento de resistência em alguns pacientes durante o tratamento. Embora os mecanismos bioquímicos exatos dessa resistência ainda não sejam completamente compreendidos, seu estudo pode fornecer informações valiosas para a criação de novas estratégias terapêuticas e o desenvolvimento de fármacos mais eficazes (Sousa *et al.*, 2014).

Uma vez que a migração celular é crucial para formação de metástases e, vários intermediários celulares podem favorecer a transição da célula tumoral para um fenótipo mais agressivo, o estudo de moléculas capazes de intermediar e regular este mecanismo torna-se de grande valia. Neste contexto, o óxido nítrico (NO) um radical livre simples, multifuncional, capaz de regular inúmeros processos biológico tem um caráter duplo no câncer, com efeitos dependentes de sua concentração (Cinelli *et al.*, 2020). Estudos mostram que níveis baixos de NO, induzem proliferação tumoral e a angiogênese, favorecendo a progressão e metástase; já em concentrações elevadas, induz apoptose em células cancerosas (Sun *et al.*, 2023; Fang *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2023).

No presente trabalho, a avaliação dos níveis de NO mostrou maiores concentrações no tempo de 48h em todos os tratamentos quando comparadas as concentrações no tempo de 24h. Análises da produção de NO entre os tratamentos considerando só o tempo de 24h mostram aumento significativo desses níveis nos grupos tratados com TM *Quercus* em relação ao grupo não tratado (B16F10) e ao grupo tratado com Carboplatina (***p* = 0,0007; *** *p* = 0,0004; respectivamente). Interessantemente, diminuição dos níveis de NO foram observados, nos grupos Va 12X e Va 5LM, quando comparados com os seus respectivos veículos (H₂O 12X e H₂O 5LM, respectivamente). Este resultado corrobora resultados prévios do grupo

(Prado, 2021) também *in vitro* que mostraram redução na produção intracelular de NO após tratamento com ultradiluições de Va nas mesmas potências 12X e 5LM. Uma vez que o NO é um intermediário inflamatório e pode estar associado com a exacerbação da fadiga associada ao câncer e/ou as manifestações clínicas de dor (Costa *et al.*, 2003), a diminuição na sua produção pode explicar em parte, a melhora expressiva da qualidade de vida observada nos animais tratados com as ultradiluições Va12X e Va5LM avaliadas previamente em estudos *in vivo* do grupo.

Em relação as análises dos níveis de NO no tempo de 48h, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados. Entretanto, comportamento similar a aquele apresentado no tempo de 24h, mostra tendência de aumento nos níveis de NO após tratamento com TM e, tendência a diminuir após tratamento com as ultradiluições 12X e 5LM, em relação aos seus respectivos controles. Estes dados obtidos no tempo de 48h reforçam a necessidade de avaliações com outros tempos de tratamento (cinética) para melhor compreensão dos efeitos desses tratamentos em relação à produção de NO no modelo de melanoma.

Outro dado interessante obtido nestas análises, mostram que o tratamento com Va 200C apresentou os níveis mais baixos de NO em relação a todos os outros tratamentos, resultado que está em concordância com os achados de Prado (2021) para a mesma diluição onde avaliou espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são moléculas ou íons instáveis devido à presença de elétrons desemparelhados, o que as torna altamente reativas. Elas podem ser classificadas em dois grupos principais: radicais livres, como o NO, e compostos estáveis (Gouveia *et al.*, 2017).

Em paralelo, com o intuito de melhor caracterizar a arquitetura tumoral que possa dar indícios de agressividade a composição de fibras de colágeno foi avaliada. Conforme descrito por Junqueira *et al.* (1979), a coloração por Picrosirius, associada à análise de imagens morfométricas, permite caracterizar qualitativamente e quantitativamente as alterações na rede de colágeno em condições patológicas. No presente estudo, a análise de fibras de colágeno pela coloração de Picrosirius revelou valores menores no percentual da área de colágeno no grupo tratado com carboplatina, em comparação aos outros grupos experimentais. Porém quando comparado ao grupo álcool, utilizado como controle do veículo no preparo da TM, essa diferença chega a ser significativamente menor. Este resultado está de acordo com os estudos que demonstraram que o álcool altera a homeostase da matriz extracelular

ao estimular a deposição de colágeno e reduzir sua degradação, causando rigidez tecidual, pois o álcool pode alterar diretamente a atividade das metaloproteinases (MMPs) (Seitz e Stickel 2007; Egeblad *et al.*, 2010).

Em conjunto, os dados aqui apresentados são de grande relevância ao fornecer dados inéditos dos efeitos de ultradiluições de Va na migração de células de melanoma murino e, na diminuição dos níveis de NO, que podem estar associados com a melhora da qualidade de vida de animais com melanoma. Diante do exposto, o presente trabalho propõe a utilização das potências de Va 12X e 5LM, preparadas a partir de TM de extratos hidroalcóolicos, obtidos de amostras de Va coletados da espécie hospedeira *Quercus rubor* na estação de verão, como medicamentos promissores na terapia integrativa para o tratamento do melanoma e, evidenciam ainda, a necessidade de mais pesquisas para consolidar esses achados e estabelecer novos protocolos terapêuticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resultados aqui obtidos indicam que as ultradiluições de *Viscum album* L. (Va) não interferem na capacidade de migração das células de melanoma murino B16F10, atendendo ao objetivo geral proposto. A análise da migração celular demonstrou que os grupos tratados com ultradiluições de Va apresentaram dinâmicas de fechamento de feridas significativamente diferentes ao longo do tempo, sugerindo que os tratamentos podem modular o comportamento migratório das células tumorais. A exceção foi observada no grupo tratado com Carboplatina, que apresentou diferenças mais expressivas em comparação aos demais tratamentos, o que reforça sua influência como agente quimioterápico.

Em relação aos níveis de NO, os resultados mostraram aumento na produção de óxido nítrico (NO) nas células tratadas com ultradiluições de Va, especialmente no tempo de 48 horas. Diminuição na produção de NO foi observada nas células de melanoma após 24h de tratamento com as potências de Va 12X e 5LM, corroborando resultados prévios do grupo realizados em modelo *in vitro*. Estes achados sugerem o potencial terapêutico promissor de medicamentos ultradiluídos de *Viscum álbum* nas potências 12X e 5LM como terapia integrativa no tratamento do melanoma.

Em relação à arquitetura tecidual, a avaliação de biopsias de tumores coletadas

de estudo anterior *in vivo* do grupo, não demonstraram diferenças expressivas no percentual de colágeno nos tratamentos com TM ou ultradiluições de VA, diferentemente do quimioterápico Carboplatina que apresentou níveis menores significativos no tempo 48h. Os resultados apontam a necessidade de novos estudos para verificar possíveis modificações estruturais associadas ao tratamento com ultradiluições de Va, que poderão contribuir para uma melhor compreensão de seu impacto no microambiente tumoral.

Contudo, resultados aqui obtidos são de alta relevância para o estabelecimento de novos protocolos no tratamento do câncer, utilizando preparações de Va ultradiluído como medicamentos promissores para uso integrativo em pacientes oncológicos.

Pontos de destaque do trabalho (*Highlight*)

- Em testes de Wound Healing (WH), as ultradiluições de Va não afetaram diretamente a migração celular de melanoma, mas sugerem efeitos sobre a agressividade das células tumorais e sua capacidade metastática.
- Foi observada uma redução significativa dos níveis de NO após o tratamento com as potencias VA 12X e 5LM.
- A análise de picosirius não demonstrou diferenças significativas em relação ao percentual de colágeno nos grupos tratados com as ultradiluições 12X, 200C e 5LM testadas.

Auxílios

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – PROSUP).

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.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. P. de; MONCHAK, I. T.; COSTA BATISTA, J. V. da; GRAZI, M.; RAMM, H.; RAMAN, V.; BAUMGARTNER, S.; HOLANDINO, C.; MANFRON, J. Investigations on the morpho-anatomy and histochemistry of the European mistletoe: *Viscum album* L. subsp. *album*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 4604, 21 mar. 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-29799-z.

ARIMOTO, Akira *et al.* Immunosuppression induced by perioperative peritonitis promotes lung metastasis. **Anticancer Research**, v. 38, n. 7, p. 4333-4338, 2018.

ARTOSI, F.; COSTANZA, G.; DI PRETE, M.; GAROFALO, V.; LOZZI, F.; DIKA, E.; COSIO, T.; DILUVIO, L.; SHUMAK, R. G.; LAMBIASE, S.; DI RAIMONDO, C.; CAMPA, S.; PISCITELLI, P.; MIANI, A.; BIANCHI, L.; CAMPIONE, E. Epidemiological and clinical analysis of exposure-related factors in non-melanoma skin cancer: A retrospective cohort study. **Environmental Research**, v. 247, p. 118117, 2014. doi: 10.1016/j.envres.2024.118117.

BAGOT, J. L.; LEGRAND, A.; THEUNISSEN, I. Use of Homeopathy in Integrative Oncology in Strasbourg, France: Multi-center Cross-Sectional Descriptive Study of Patients Undergoing Cancer Treatment. **Homeopathy**, 2021.

BEERMANN, Anke *et al.* A randomized placebo-controlled double-blinded study comparing oral and subcutaneous administration of mistletoe extract for the treatment of equine sarcoid disease. **Journal of veterinary internal medicine**, 2024.

BETTI, Lucietta *et al.* Use of homeopathic preparations in phytopathological models and in field trials: a critical review. **Homeopathy**, v. 98, n. 04, p. 244-266, 2009.

BIEGEL, U.; MEVISSEN, M.; SCHULLER, S.; RUESS, K.; CHRISTEN, O.; AYRLE, H.; KOCH, C.; WALKENHORST, M. *Viscum album* L., a therapeutic option for neoplastic diseases in companion animals? A systematic review. **Complementary Medicine Research**, v. 29, n. 6, p. 465-482, 2022. DOI: 10.1159/000525035.

BONAMIN. L.; WAISSE S. Transdisciplinarity and Translationality in High Dilution Research: Signals and Images Giri Series. **Cambridge Scholars Publishing**, 2019.

BONATO, C. M. (cord). **Homeopatia Simples**: alternativa para agricultura familiar. Marechal Candido Rondon: Gráfica Escala, 4. ed. 50 p. 2014. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/400657123/Cartilha-Homeopatia-VersaoDiagramada-2014>.

BRAGA, Geórgia *et al.* Cutaneous melanoma and purinergic modulation by phenolic compounds. **Purinergic Signalling**, p. 1-13, 2024.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM I.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024. doi: 10.3322/caac.21834. Epub 2024 Apr 4.

BRIZZI, Maurizio *et al.* The Efficacy of Ultramolecular Aqueous Dilutions on a Wheat Germination Model as a Function of Heat and Aging-Time. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. 1, p. 696298, 2011.

CARVALHO, A. C. **Atividade anti-neoplásica de *Viscum album* (L.) em tumores experimentais**: revisão crítica e estudo experimental em tumor de ehrlich. Tese de Doutorado. Universidade Paulista. 2015.

CARVALHO, A. C.; PORTO, E.; BONAMIN, L. V. Canine neurofibrosarcoma treatment with *Viscum album* in serial dilutions. **International Journal of High Dilution Research**, v. 12, n. 44, p. 106-106, 2013.

CHAGAS, Jaqueline Maria *et al.* The use of integrative oncological therapy as a supplement to conventional treatment for osteosarcoma. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 1, p. 2711-2719, 2022.

CHOI, Hye Jin *et al.* Selective Immune Modulating Activities of *Viscum album* and Its Components; A Possibility of Therapeutics on Skin Rash Induced by EGFR Inhibitors. **Integrative Cancer Therapies**, v. 21, p. 15347354221118332, 2022.

CINELLI, Maris A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal research reviews**, v. 40, n. 1, p. 158-189, 2020.

COSTA, M. T.; FABENI, R. de C.; APTEKMANN, K. P.; MACHADO, R. R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 967-974, 2003. DOI: 10.1590/S0103-84782003000500027

DAWSON, Ted M.; DAWSON, Valina L. Nitric oxide signaling in neurodegeneration and cell death. **Advances in pharmacology**, v. 82, p. 57-83, 2018.

DIOS-BARBEITO, Sandra *et al.* Impact of nitric oxide in liver cancer microenvironment. **Nitric Oxide**, v. 128, p. 1-11, 2022.

EGEBLAD, Mikala *et al.* Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. **Developmental Cell**, Volume 18, Issue 6, 884 – 901, 2010.

FANG, Xiao *et al.* Photogenerated holes mediated nitric oxide production for hypoxic tumor treatment. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 13, p. 7046-7050, 2021.

FLOROS, K. V.; THOMADAKI, H.; KATSAROS, N.; TALIERI, M.; SCORILAS, A. mRNA expression analysis of a variety of apoptosis-related genes, including the novel gene of the BCL2-family, BCL2L12, in HL-60 leukemia cells after treatment with carboplatin and doxorubicin. **Biological Chemistry**, v. 385, n. 11, p. 1311-1319, jan. 2004.

GARBE, Claus *et al.* Skin cancers are the most frequent cancers in fair-skinned populations, but we can prevent them. **European journal of cancer**, v. 204, p. 114074, 2024.

GOUVEIA, Silas da Silva *et al.* Insert relationship between reactive species of oxygen and carcinogenic promotion. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 20, n. 3, p. 174-179, 2017.

HOLANDINO, C.; LEAL, F. D.; BARCELLOS, B. de O.; CAMPOS, M. A.; OLIVEIRA, R.; VEIGA, V. F.; GARCIA, S.; ZACHARIAS, C. R. Mechanical versus manual succussion: a comparative study of the physical-chemical behavior of ultradiluted and dynamized solutions. **International Journal of High Dilution Research**, v. 6, n. 19, p. 31-32, 2022. DOI: 10.51910/ijhdr.v6i19.46.

HOLANDINO, C.; MELO, M. N. O.; OLIVEIRA, A. P.; BATISTA, J. V. D. C.; CAPELLA, M. A. M.; GARRETT, R.; GRAZI, M.; RAMM, H.; TORRE, C. D.; SCHALLER, G.; URECH, K.; WEISSENSTEIN, U.; BAUMGARTNER, S. Phytochemical analysis and in vitro anti-proliferative activity of *Viscum album* ethanolic extracts. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 215, 9 jul. 2020. DOI: 10.1186/s12906-020-02987-4.

HU, Ya *et al.* The regulation of nitric oxide in tumor progression and therapy. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 2, p. 0300060520905985, 2020.

HUANG, Yu *et al.* Nitric oxide and thyroid carcinoma: A review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 1050656, 2023.

JÄGER, T.; HOLANDINO, C.; MELO, M. N. O.; PEÑALOZA, E. M. C.; OLIVEIRA, A. P.; GARRETT, R.; GLAUSER, G.; GRAZI, M.; RAMM, H.; URECH, K.; BAUMGARTNER, S. Metabolomics by UHPLC-Q-TOF reveals host tree-dependent phytochemical variation in *Viscum album* L. **Plants** (Basel), v. 10, n. 8, p. 1726, 20 ago. 2021. DOI: 10.3390/plants10081726.

JÄGER, T.; SCHERR, C.; SHAH, D.; MAJEWSKY, V.; WOLF, U.; BETTI, L.; BAUMGARTNER, S. The use of plant-based bioassays in homeopathic basic research. **Homeopathy**, v. 104, n. 4, p. 277-282, out. 2015. DOI: 10.1016/j.homp.2015.06.009

JUNQUEIRA, L. C. U., BIGNOLAS, G., BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, 11(4), 447-455, 1979.

JUSTUS, C. R.; LEFFLER, N.; RUIZ-ECHEVARRIA, M.; YANG, L. V. In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. 51046, 1 jun. 2014. DOI: 10.3791/51046.

KALIKS, Bernardo. A indicação do *Viscum album* para tratar o câncer: os fundamentos antroposóficos do tratamento do câncer com medicamentos elaborados a partir do *Viscum album*. **Arte Med. Ampl**, p. 57-64, 2017.

KÖNIGSBERGER, Karolina *et al.* *Viscum album* Lipophilic Extract in Actinic Keratosis, Cutaneous Squamous Cell Carcinoma, and Basal Cell Carcinoma: A Retrospective Case Series. **Complementary Medicine Research**, v. 31, n. 3, p. 241-252, 2024.

LAUTERS, Rebecca; BROWN, Ashley Dianne; HARRINGTON, Kari-Claudia Allen. Melanoma: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, v. 110, n. 4, p. 367-377, 2024.

LOPES, Daniela Franco; BARBOSA, Guilherme Augusto; MARQUES, Heloisa Bolonhini. Uma abordagem não convencional no tratamento do mesotelioma peritoneal canino com *Viscum album* ultradiluído: relato de caso. **International Journal of Homeopathic Science**, v. 5, n. 3, p. 329-333, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33545/26164485.2021.v5.i3e.444>.

LÓPEZ-SÁNCHEZ, Laura M.; ARANDA, Enrique; RODRIGUEZ-ARIZA, Antonio. Nitric oxide and tumor metabolic reprogramming. **Biochemical pharmacology**, v. 176, p. 113769, 2020.

MANSKY, Patrick J. *et al.* NCCAM/NCI phase 1 study of mistletoe extract and gemcitabine in patients with advanced solid tumors. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 1, p. 964592, 2013.

MELO, M. N. O.; BATISTA, J. V. D. C.; PEÑALOZA, E. M. C.; OLIVEIRA, A. P.; GARRETT, R.; BAUMGARTNER, S.; HOLANDINO, C. A scoping review of genus *Viscum*: biological and chemical aspects of alcoholic extracts. **Plants** (Basel), v. 12, n. 9, p. 1811, 28 abr. 2023. DOI: 10.3390/plants12091811.

MELO, M. N. O.; OCHIONI, A. C.; ZANCAN, P.; OLIVEIRA, A. P.; GRAZI, M.; GARRETT, R.; HOLANDINO, C.; BAUMGARTNER, S. *Viscum album* mother tinctures: Harvest conditions and host trees influence the plant metabolome and the glycolytic pathway of breast cancer cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1027931, 31 out. 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.1027931.

MELO, M. N. O.; OLIVEIRA, A. P.; WIECIKOWSKI, A. F.; CARVALHO, R. S.; CASTRO, J. L.; OLIVEIRA, F. A. G.; PEREIRA, H. M. G.; VEIGA, V. F. da; CAPELLA, M. M. A.; ROCHA, L.; HOLANDINO, C. Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 3, p. 311-322, mar. 2018. DOI: 10.1016/j.jsps.2018.01.011

MIRANDA, Katrina M. *et al.* Nitric oxide and cancer: When to give and when to take away?. **Inorganic Chemistry**, v. 60, n. 21, p. 15941-15947, 2021.

NWAFOR, Jane N. *et al.* The Role of Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Different Stages of Melanoma. **Cureus**, v. 15, n. 5, 2023.

PALLER, Channing J. *et al.* Phase I trial of intravenous mistletoe extract in advanced cancer. **Cancer Research Communications**, v. 3, n. 2, p. 338-346, 2023.

PINTO, Carolina Marques. **Mecanismos de resistência do melanoma metastático à quimioterapia e abordagem de novos alvos terapêuticos**. 2022. Dissertação

(Mestrado Integrado, Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2022.

PRADO, P. I. B. **Avaliação *in vitro* do efeito de preparações homeopáticas de *Viscum album* sobre células de melanoma murino**. 2021. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unip.br/wp-content/uploads/tainacan-items/212/85260/PRADO-P-I-B-do-P.pdf> Acesso em: 05 nov. 2024.

RAIMONDI, Sara; SUPPA, Mariano; GANDINI, Sara. Melanoma epidemiology and sun exposure. **Acta dermato-venereologica**, v. 100, n. 11, 2020.

RAJENDRAN, E. S. Nanomaterial characterisation of diluted Platina and alcohol control samples. **Homeopathy**, v. 112, n. 03, p. 144-151, 2023.

RAMÍREZ-PATIÑO, R. *et al.* Influence of nitric oxide signaling mechanisms in cancer. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 36, p. 03946320221135454, 2022.

RAYMOND-LEZMAN, Jonathan R.; RISKIN, Suzanne. Attitudes, behaviors, and risks of sun protection to prevent skin cancer amongst children, adolescents, and adults. **Cureus**, v. 15, n. 2, 2023.

REMYA, V.; KUTTAN, G. Homeopathic remedies with antineoplastic properties have immunomodulatory effects in experimental animals. **Homeopathy**, v.104(3), p. 211-219, 2015.

ROCHA, M. S.; BATISTA, J. V. C.; MELO, M. N. O.; CAMPOS, V. E. B.; TOLEDO, A. L. M. M.; OLIVEIRA, A. P.; PICCIANI, P. H. S.; BAUMGARTNER, S.; HOLANDINO, C. Pluronic® F127 thermoresponsive *Viscum album* hydrogel: physicochemical features and cellular in vitro evaluation. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2775, 12 dez. 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122775.

RODRIGUES, Eliana; MASTROIANNI, Patrícia de Carvalho. **Produtos à base de plantas: efetividade e segurança no tratamento de pacientes oncológicos**. 2020.

SÁ, F., SANTOS, R. Homeopatia: histórico e fundamentos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 60–78, 2014. DOI:10.31072/rcf.v5i1.206.

SAEED, W.; SHAHBAZ, E.; MAQSOOD, Q.; ALI, S. W.; MAHNOOR, M. Cutaneous oncology: strategies for melanoma prevention, diagnosis, and therapy. **Cancer Control**, v. 31, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/10732748241274978>.

SANCHES, Larissa Juliani. **Avaliação do efeito citotóxico do citral sobre células de melanoma murino metastático B16F10**. 2014. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

SANTOS, Catarina Azevedo Moia Lopes. **A importância da imunomodulação parasitária. Justifica-se uma nova abordagem aos protocolos de desparasitação.** 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro (Portugal).

SANTOS, Marcell et al. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023.

SAUD, Anoosha et al. Melanoma metastasis: What role does melanin play?. **Oncology Reports**, v. 48, n. 6, p. 217, 2022.

SCHAD, F.; THRONICKE, A. Safety of combined targeted and Helixor® Viscum album L. therapy in breast and gynecological cancer patients, a real-world data study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 3, p. 2565, 31 jan. 2023. DOI: 10.3390/ijerph20032565.

SCHNELL-INDERST, Petra et al. Additional treatment with mistletoe extracts for patients with breast cancer compared to conventional cancer therapy alone—efficacy and safety, costs and cost-effectiveness, patients and social aspects, and ethical assessment. **GMS German Medical Science**, v. 20, 2022.

SEITZ, H., STICKEL, F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 599–612, 2007.

SERMAN, N.; VRANIC, S.; GLIBO, M.; SERMAN, L.; BUKVIC MOKOS, Z. Genetic risk factors in melanoma etiopathogenesis and the role of genetic counseling: A concise review. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 5, p. 673-682, 16 set. 2022. DOI: 10.17305/bjbms.2021.7378.

SHIN, J.; YIM, E.; KANG, C. M. Viscum album, as alternative and bridge to palliative chemotherapy in recurrent gallbladder cancer following laparoscopic radical cholecystectomy: a case report. *Korean Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n. 2, p. 88-92, dez. 2023. DOI: 10.14216/kjco.23016.

SHREBERK-HASSIDIM, R.; OSTROWSKI, S. M.; FISHER, D. E. The complex interplay between nevi and melanoma: risk factors and precursors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 3541, 2023. DOI: 10.3390/ijms24043541.

SILVA, T. C. Estudo dos efeitos in vivo de preparações homeopáticas de Viscum album no modelo de melanoma murino. 2023. Tese (Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

SOUSA, Grazielle Fonseca de. **Identificação de alvos moleculares associados à resistência e à sensibilidade aos antitumorais carboplatina e análogos de rebecamicina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular.** 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. DOI: 10.11606/D.9.2013.tde-27022014-103617.

SOUSA, G. F. de; WLODARCZYK, S. R.; MONTEIRO, G. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. **Brazilian Journal of**

Pharmaceutical Sciences, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 693–701, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400004>

SUN, Steven H. *et al.* Btk inhibition potentiates anti-pd-l1 treatment in murine melanoma: potential role for mdsc modulation in immunotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 72, n. 11, p. 3461-3474, 2023.

SUN, Y.; SHEN, Y.; LIU, Q.; ZHANG, H.; JIA, L.; CHAI, Y.; JIANG, H.; WU, M.; LI, Y. Global trends in melanoma burden: A comprehensive analysis from the Global Burden of Disease Study, 1990-2021. **Journal of the American Academy Dermatology**, v. 92, n. 1, p. 100-107, 2025. doi: 10.1016/j.jaad.2024.09.035.

TEIXEIRA, Marcus Zulian; CARNEIRO, Solange M.T.P.G. Efeito de ultradiluições homeopáticas em plantas: revisão da literatura. **Revista de Homeopatia**, v. 80, n. 1/2, p. 113-132, 2017.

THRONICKE, A.; SCHAD, F.; DEBUS, M.; GRABOWSKI, J.; SOLDNER, G. Viscum album L. therapy in oncology: an update on current evidence. **Complementary Medicine Research**, v. 29, n. 4, p. 362-368, 2022. DOI: 10.1159/000524184.

TOUSSI, A.; MANS, N.; WELBORN, J.; KIURU, M. Germline mutations predisposing to melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 47, p. 606–616, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cup.13689>.

TSEKOURAS, V.; MAVRIKOU, S.; VLACHAKIS, D. *et al.* Proteome analysis of leaf, stem and callus in Viscum album and identification of lectins and viscotoxins with bioactive properties. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, p. 167–178, 2020. DOI: 10.1007/s11240-020-01777-7.

ULLMAN, Dana. Exploring possible mechanisms of hormesis and homeopathy in the light of nanopharmacology and ultra-high dilutions. **Dose-Response**, v. 19, n. 2, p. 15593258211022983, 2021.

UPADHYAY, R. P. Earliest medicines evolved from dangerous environmental stressors to support life on a hostile earth: a nanoparticle and water-based evolutionary theory. **Water**, v. 11, p. 55-77, 2020.

VOLTARELLI, F.A.; FRAJACOMO, F.T.; PADILHA, C.S.; TESTA, M.T.J.; CELLA, P.S.; RIBEIRO, D.F.; de OLIVEIRA, D.X.; VERONEZ, L.C.; BISSON, G.S.; MOURA, F.A.; DEMINICE, R. Syngeneic B16F10 melanoma causes cachexia and impaired skeletal muscle strength and locomotor activity in mice. **Frontiers Physiology**, v. 8, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00715

WAISSE, Silvia. Efeito de ultradiluições homeopáticas em modelos in vitro: revisão da literatura. **Revista de Homeopatia**, v. 80, n. 1/2, p. 98-112, 2017.

WHO, World Health Organization. **Invisible numbers**: the true extent of noncommunicable diseases and what to do about them. World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240057661> Acesso em: 28 out. 2024.

WOLFF, C.; BRAGANHOLO, D. A.; SILVA, G. V. da; ROSA, J. C. da S.; FIDELIS, L. T. V.; GARCIA, L. L. de F.; TEIXEIRA, L. E. de M. M.; BIRRO, M. L. G.; TAMBONE, S. B.; OLIVEIRA, M. F. de. O trabalho multiprofissional nos cuidados paliativos: um diálogo entre a medicina funcional integrativa e a atenção psicológica. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 39, p. e9459, 27 dez. 2021.

YAMAUCHI, T.; SHANGRAW, S.; ZHAI, Z.; RAVINDRAN MENON, D.; BATTI, N.; DELLAVALLE, R. P.; FUJITA, M. Alcohol as a non-UV social-environmental risk factor for melanoma. **Cancers**, v. 14, p. 5010, 2022. DOI: 10.3390/cancers14205010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers14205010>.

YOSRI, Nermeen; KAMAL, Nurkhalida; MEDIANI, Ahmed; ABOUZID, Sameh; SWILLAM, Ahmed; SWILAM, Mahmoud; AYYAT, Ahmed M.; JANTAN, Ibrahim. Immunomodulatory activity and inhibitory effects of *Viscum album* on cancer cells, its safety profiles and recent nanotechnology development. **Planta Medica**, v. 90, n. 14, p. e3-e3, 2024. DOI: 10.1055/a-2423-9185.

ZOCCHI, Lamberto; LONTANO, Alberto; MERLI, Martina; DIKA, Emi; NAGORE, Eduardo; QUAGLINO, Pietro; PUIG, Susana; RIBERO, Simone. Familial melanoma and susceptibility genes: a review of the most common clinical and dermoscopic phenotypic aspect, associated malignancies and practical tips for management. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 16, p. 3760, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm10163760>.

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 (00 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 murino melanoma model", utilizing 70 isogenics mice (70 females), protocol number CEUA 6777120620 (00 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

Quantidade: 70

Linhagem: C57BL/6 specific pathogen-free (SPF)

Peso: 17 a 23 g

São Paulo, 04 de fevereiro de 2025



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



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



TERMO DE DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Eu, Elizabeth Cristina Perez Hurtado, inscrita no CPF sob o nº 227.513.128-02, venho por meio deste AUTORIZAR a doação de biópsias de tumores, mantidas em blocos de parafina (total de 21 blocos), coletadas durante o desenvolvimento do projeto de doutorado intitulado: "Estudo dos efeitos *in vivo* de preparações homeopáticas de *Viscum album* (L.) no modelo de melanoma murino", aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA – UNIP) em reunião realizada no dia 07/10/2020, com o protocolo nº 6777120620 (anexo), e finalizado em 2023.

São Paulo, 01 de fevereiro de 2024.



Elizabeth Cristina Perez Hurtado
Professora Titular

Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental