

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

**EFEITOS DAS PREPARAÇÕES ULTRADILUÍDAS DE *Viscum album* NA**  
**ATIVAÇÃO DO INFLAMOSSOMA NLRP3 NAS CÉLULAS DE MELANOMA**  
**MURINO.**

**PRISCILA INHAUSER BALTUILLE DO PRADO**

**SÃO PAULO**  
**2025**

**PRISCILA INHAUSER BALTUILLE DO PRADO**

**EFEITOS DAS PREPARAÇÕES ULTRADILUÍDAS DE *Viscum album* NA  
ATIVACÃO DO INFLAMOSSOMA NLRP3 NAS CÉLULAS DE MELANOMA  
MURINO.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

Coorientadores: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva; Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin.

**SÃO PAULO**

**2025**

Prado, Priscila Inhauser Baltuille do.

Efeitos das preparações ultradiluídas de *Viscum album* na ativação do inflamossoma NLRP3 nas células de melanoma murino / Priscila Inhauser Baltuille do Prado. - 2025.

53 f. : il. color.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2025.

Área de concentração: Ecotoxicologia e Inovações Terapêuticas.

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

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foqanholi da Silva.

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

1. Câncer de pele. 2. Citocinas inflamatórias. 3. Imunorregulação. 4. microRNAs. 5. Oncologia integrativa. I. Hurtado, Elizabeth Cristina Perez (orientadora). II. Silva, Rodrigo Augusto Foqanholi da (orientador). III. Bonamin, Leoni Villano (orientadora). IV. Título.

**PRISCILA INHAUSER BALTUILLE DO PRADO**

**EFEITOS DAS PREPARAÇÕES ULTRADILUÍDAS DE *Viscum album* NA  
ATIVAÇÃO DO INFLAMOSSOMA NLRP3 NAS CÉLULAS DE MELANOMA  
MURINO.**

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Profa. Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ivana Barbosa Suffredini  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Profa. Dra. Liliana del Valle Sosa  
Universidad Nacional de Córdoba – Argentina

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos companheiros animais de ontem, hoje e sempre.

## AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Paulista – UNIP pela infraestrutura.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da UNIP pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao corpo docente do referido programa de pós-graduação por todo conhecimento compartilhado.

À Profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado pela orientação e acompanhamento.

Aos Professores Doutores Rodrigo Augusto Foganholi da Silva e Leoni Villano Bonamin pela coorientação e auxílio.

Aos colaboradores do Instituto Hiscia – VFK, Stephan Baumgartner e Carla Holandino pelo conhecimento compartilhado e pela oportunidade de estágio internacional.

À Farmácia de Manipulação HNCristiano pelo fornecimento das medicações.

À amiga Cristiane de Moraes pelo auxílio nos experimentos.

Aos alunos de IC e aos funcionários do Centro de Pesquisa por todo auxílio e dedicação.

À minha família e marido, pela compreensão e suporte emocional.

*"Entre o visível e o invisível, pulsa o essencial."*

– Anônimo

## RESUMO

O extrato de *Viscum album* (Va) conhecido também como *mistletoe* é usado como abordagem integrativa no tratamento de pacientes oncológicos, bem como o uso de suas ultradiluições homeopáticas. Estudos prévios do grupo com ultradiluições de Va no modelo de melanoma murino demonstraram que, *in vitro*, induz modulação do metabolismo celular, do estresse oxidativo e do perfil de citocinas inflamatórias, e *in vivo*, leva à melhora do estado geral e qualidade de vida de camundongos com melanoma. Considerando que parâmetros de bem-estar e qualidade de vida podem ser influenciados por mediadores inflamatórios, liberados pela ativação do complexo inflamossoma NLRP3, cuja expressão pode estar regulada epigeneticamente pela expressão de microRNAs (miRNAs), o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes preparações de *Viscum album* (tinturas-mães e ultradiluições nas escalas 12X, 200CH e 5LM), obtidas de diferentes árvores hospedeiras (*Quercus robur* e *Abies alba*), sobre a ativação do inflamossoma NLRP3, a produção de citocinas inflamatórias e a expressão de miRNAs reguladores em células de melanoma murino B16F10. Os dados demonstraram que VaAa 12X induziu aumento significativo de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  após 24 horas, sugerindo ativação de vias pró-inflamatórias e possível envolvimento do inflamossoma. As tinturas-mães, sobretudo VaAa, promoveram aumento de diversas citocinas inflamatórias (IL-6, IL-12p40/p70, IL-18 e TNF- $\alpha$ ) após 1 hora de tratamento, evidenciando sua conhecida citotoxicidade e ação imediata sobre o sistema imune celular. Em relação à expressão de NLRP3, observou-se redução com VaQr 5LM e controles após 1 hora, e aumento com VaAa 5LM após 24 horas. A análise dos miRNAs revelou modulação positiva do miR-223 por VaQr 200CH e VaAa 200CH, além de alterações na expressão dos genes relacionados à biogênese desses miRNAs (Drosha, Xpo5 e Dicer), especialmente após tratamento com tinturas-mãe. Com isso, sugere-se que Va, mesmo em preparações ultradiluídas, é capaz de interagir com vias inflamatórias e epigenéticas, a depender da dose e do tempo de tratamento, afetando o microambiente tumoral. Estes resultados são inéditos e auxiliam no estabelecimento de uma correlação dos achados anteriores do grupo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, fornecendo informações significativas para compreensão

dos mecanismos de ação das ultradiluições de Va no modelo de melanoma murino.

**Palavras-chave:** câncer de pele, citocinas inflamatórias, imunorregulação, microRNAs, oncologia integrativa.

## ABSTRACT

Viscum album (Va) extract, also known as mistletoe, is used as an integrative approach in cancer patient care, including its homeopathic ultradiluted forms. Previous studies from our group using Va ultradilutions in a murine melanoma model demonstrated that these preparations modulate cellular metabolism, oxidative stress, and the inflammatory cytokine profile *in vitro*. *In vivo*, they improve the general condition and quality of life of melanoma-bearing mice. Considering that well-being and quality-of-life parameters may be influenced by inflammatory mediators—released through activation of the NLRP3 inflammasome complex, whose expression can be epigenetically regulated by microRNAs (miRNAs). The present study aimed to evaluate the effects of different Viscum album preparations (mother tinctures and ultradilutions in the 12X, 200CH, and 5LM potencies), derived from different host trees (*Quercus robur* and *Abies alba*), on NLRP3 inflammasome activation, inflammatory cytokine production, and regulatory miRNA expression in B16F10 murine melanoma cells. Our data demonstrated that VaAa 12X significantly increased IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels after 24 hours, suggesting activation of pro-inflammatory pathways and possible inflammasome involvement. The mother tinctures, particularly VaAa, promoted a marked increase in several inflammatory cytokines (IL-6, IL-12p40/p70, IL-18, and TNF- $\alpha$ ) after only 1 hour of treatment, highlighting their known cytotoxicity and immediate effects on the cellular immune system. Regarding NLRP3 expression, a reduction was observed with VaQr 5LM and control treatments after 1 hour, whereas an increase was noted with VaAa 5LM after 24 hours. miRNA analysis revealed upregulation of miR-223 by VaQr 200CH and VaAa 200CH, in addition to altered expression of genes involved in these miRNA biogenesis (*Drosha*, *Xpo5*, and *Dicer*), particularly following mother tincture treatments. These findings suggest that Va, even in ultradiluted forms, can interact with inflammatory and epigenetic pathways depending on dose and treatment duration, thereby influencing the tumor microenvironment. These novel results help establish a correlation with previous *in vitro* and *in vivo* findings from our group, providing valuable insights into the mechanisms of action of Va ultradilutions in the murine melanoma model.

**Keywords:** skin cancer, inflammatory cytokines, immune regulation, microRNAs, integrative oncology

## SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1 Melanoma.....	11
1.2 Câncer e Modulação Imune.....	12
1.3 Complexo Inflamossoma NLRP3.....	13
1.4 Regulação Epigenética e sua Influência na Oncogênese.....	15
1.5 Função e Mecanismos dos miRNAs: miR-22 e miR-223.....	17
1.6 Viscum album e Modulação Epigenética no Câncer.....	19
REFERÊNCIAS.....	22
2. ARTIGO.....	29
Resumo.....	29
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
Medicamentos e veículos.....	32
Cultura celular.....	33
Viabilidade celular pelo método de exclusão por Trypan blue.....	34
Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias por citometria de fluxo.....	34
Extração de RNA total.....	35
Síntese de DNA complementar (cDNA).....	35
Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR).....	36
Análise estatística.....	37
RESULTADOS.....	37
Quantificação de Citocinas Inflamatórias.....	37
Avaliação da Expressão de gênica.....	40
Avaliação da Expressão de miRNAs.....	40
DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÕES.....	46

CONFLITOS DE INTERESSE .....	47
FINANCIAMENTO .....	47
REFERÊNCIAS .....	48

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Melanoma

O melanoma é uma neoplasia maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina presentes em diversas regiões do organismo. Trata-se de um câncer agressivo, cuja incidência mundial tem aumentado rapidamente, sendo responsável pela maioria das mortes por câncer de pele, apesar de representar menos de 5% dos casos registrados (VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020; AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020; STRUB; BALLOTTI; BERTOLOTTO, 2020; DENG *et al.*, 2022; LEÃO *et al.*, 2024; HUO *et al.*, 2025; PEREIRA *et al.*, 2025).

Nos Estados Unidos, o melanoma ocupa o quinto lugar entre os cânceres mais diagnosticados em homens e o sexto entre as mulheres (AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020; PEREIRA *et al.*, 2025), com uma taxa de crescimento superior à de outros tumores, ficando abaixo apenas do câncer de pulmão (VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020). No Brasil, em 2019, estimou-se que as mortes por neoplasias cutâneas ultrapassaram 230 mil pessoas, sendo cerca de 120 mil homens e 110 mil mulheres (LEÃO *et al.*, 2024). Dentre essas, 1.978 mortes foram especificamente por melanoma, sendo 1.159 homens e 819 mulheres, reforçando o impacto desse subtipo agressivo de câncer de pele no país (INCA, 2019).

Embora o diagnóstico precoce permita um bom prognóstico e sobrevida, sua alta taxa de metástase dificulta o tratamento e piora o prognóstico (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020; STRUB; BALLOTTI; BERTOLOTTO, 2020; LEÃO *et al.*, 2024; PEREIRA *et al.*, 2025).

Além de sua relevância para a saúde humana, o melanoma também afeta os animais. Nos cães, a forma oral predomina em cerca de 62% dos casos, sendo o quarto tipo de câncer mais frequente e a neoplasia bucal mais comum, sobretudo em cães idosos e de pigmentação acentuada (GILLARD *et al.*, 2014; VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2022; CARRILHO, 2024). Nos gatos, embora seja raro, o melanoma ocular ocorre com maior frequência do que o cutâneo, apresentando uma taxa de metástase de 63% (VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020). Estes dados evidenciam a importância do melanoma na oncologia

humana e veterinária, reforçando a necessidade de avanços em estratégias preventivas e terapêuticas.

## 1.2 Câncer e Modulação Imune

Em condições patológicas, como neoplasias, doenças neurodegenerativas e inflamatórias crônicas, tanto animais quanto humanos apresentam alterações de comportamento, um fenômeno conhecido como síndrome do comportamento doentio (OMDAL, 2020; SCHMITT, 2025). Essa condição, estudada de maneira multi e interdisciplinar, afeta a qualidade de vida de pacientes humanos e animais, manifestando-se por sintomas como fadiga crônica, redução do apetite e retraimento social (OMDAL, 2020; KONSMAN, 2021; SCHMITT, 2025).

Esse quadro é compreendido como algo complexo, decorrente da ativação de mediadores imunológicos que promovem a neuroinflamação, interferindo no metabolismo e na regulação celular (OMDAL, 2020; SCHMITT, 2025). Estudos indicam que o estresse psicossocial influencia na produção de citocinas inflamatórias por macrófagos, incluindo IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  (SCHMITT, 2025), que desempenham papéis críticos no desenvolvimento tumoral.

Dentre as interleucinas moduladoras do câncer, a IL-6 se destaca por sua ação pró-inflamatória e angiogênica, contribuindo para a progressão tumoral e resistência imune (SHEN et al, 2022; BAILLIF et al., 2025; GHALWASH et al., 2025). Em contrapartida, as IL-12p40 e IL-12p70 exercem funções antitumorais, estimulando Linfócitos T e células NK, de forma que seu potencial como adjuvante terapêutico vem sendo investigado (DELLALIBERA-JOVILIANO et al., 2024; SAINI et al., 2025).

A IL-23, composta por IL-12p40 e IL-23p19, apresenta um papel ambíguo no câncer, podendo atuar tanto na progressão tumoral quanto na regulação imunológica (CHEN et al., 2025; VALENTI et al., 2025; MADDEN et al., 2025). De forma semelhante, o TNF- $\alpha$ , produzido por macrófagos, colabora na defesa contra infecções, mas também favorece angiogênese e um ambiente inflamatório propício à proliferação tumoral (SOMOVA et al, 2024; ĆWIKLIŃSKA-DWORAKOWSKA et al, 2025; CHIVITE-LACABA et al, 2025).

Outra citocina pró-tumoral é a quimiocina CXCL1, conhecida como “fator de atividade estimuladora do crescimento do melanoma” (MGSA), que tem importante função de recrutamento de neutrófilos que acaba por promover angiogênese e colaborar com a migração e progressão tumoral, além disso seus altos níveis estão relacionados com pior prognóstico e sobrevida (LA'AH et al, 2024; DANG et al, 2024; LIU et al, 2025).

Com destaque para as funções da IL-1 $\beta$ , que, além de induzir carcinogênese, está fortemente relacionada à neuroinflamação e alterações de comportamento, influenciando sintomas como fadiga, anorexia e apatia (OMDAL, 2020; VENTURA *et al.*, 2020; KONSMAN, 2021; VALENCIA *et al.*, 2021; KINRA *et al.*, 2023; KODI *et al.*, 2024; SAFI *et al.*, 2024).

A IL-18, por sua vez, apresenta dupla função nos processos neoplásicos, favorecendo angiogênese e progressão tumoral, mas também ativando Linfócitos T e macrófagos, induzindo respostas antitumorais (ĆWIKLIŃSKA-DWORAKOWSKA et al, 2025; AGRAWAL *et al.*, 2025).

Esses fatores evidenciam o papel crucial do sistema imunológico na regulação tumoral, reforçando a necessidade de investigações sobre a modulação inflamatória no câncer e seu impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes.

### 1.3 Complexo Inflamossoma NLRP3.

O inflamossoma NLRP3 é um complexo intracelular importante na resposta inflamatória do organismo, desempenhando um papel fundamental na ativação da caspase-1, que leva à produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 (HAMARSHEH; ZEISER, 2020; VALENCIA *et al.*, 2021; KINRA *et al.*, 2023; SAFI *et al.*, 2024; AGRAWAL *et al.*, 2025). Sua ativação ocorre por meio de uma cascata de eventos envolvendo as proteínas ASC, caspase-1 e NLRP3, sendo essencial para o funcionamento da imunidade inata (HAMARSHEH; ZEISER, 2020; VALENCIA *et al.*, 2021; KINRA *et al.*, 2023).

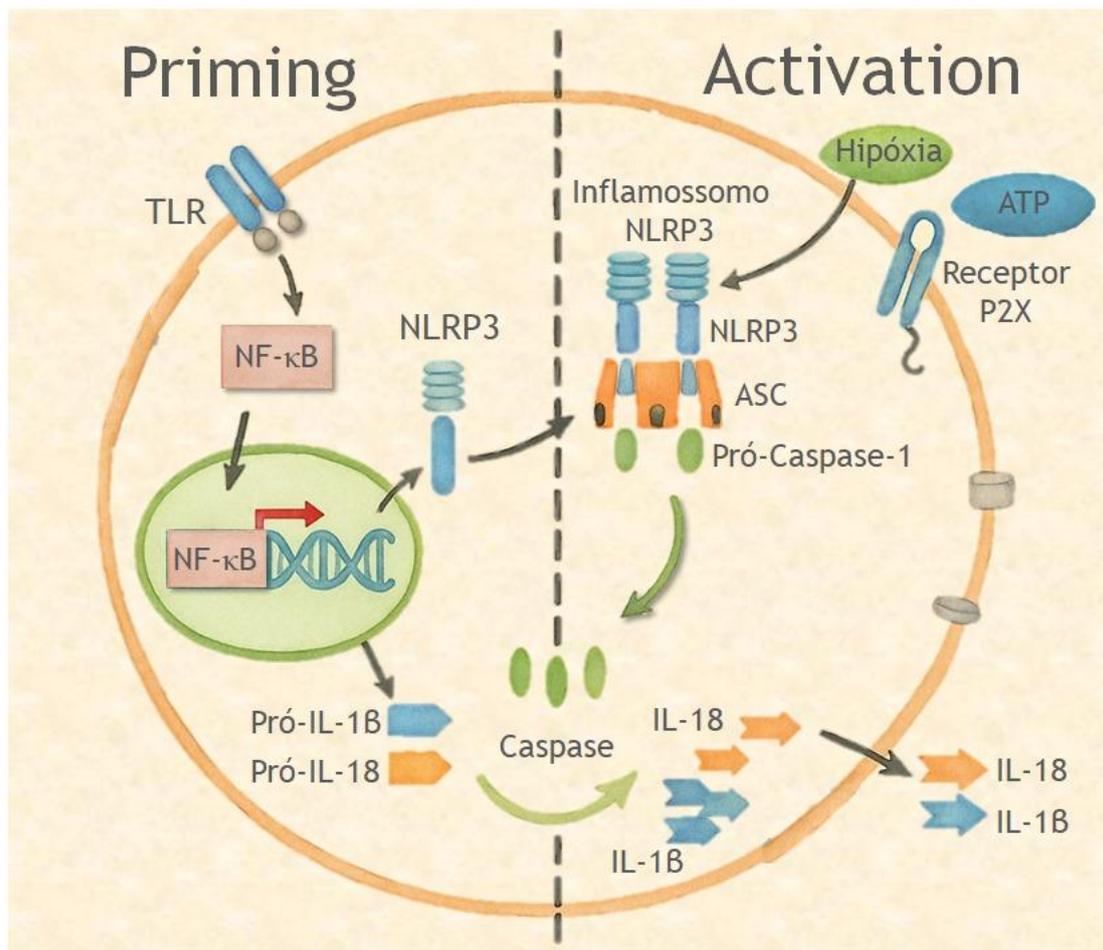
A cascata de ativação do inflamossoma NLRP3 pode ser dividida em duas etapas principais (**Ilustr.1**):

1. *Priming* (Preparação) – O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano

celular (DAMPs) ativa receptores TLRs (*Toll-like receptors*), levando à ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que aumenta a expressão dos genes NLRP3, e IL-1 $\beta$  e IL-18, nas formas de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 (DAVANZO, 2017; SAFI *et al.*, 2024; AGRAWAL *et al.*, 2025).

2. *Activation* (Ativação) – Estímulos como ATP extracelular, cristais de ácido úrico, radicais livres (ROS) e danos lisossômicos desencadeiam a montagem do inflamossoma NLRP3, levando ao recrutamento da proteína ASC, que ativa a caspase-1 (DAVANZO, 2017; KINRA *et al.*, 2023; SAFI *et al.*, 2024). Esta enzima, por sua vez, cliva as formas precursoras pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18, tornando-as ativas e permitindo sua liberação no meio extracelular, onde promovem inflamação e resposta imunológica (DAVANZO, 2017; VALENCIA *et al.*, 2021; SAFI *et al.*, 2024).

**Ilustração 1:** Cascata de ativação do Complexo Inflamossoma NLRP3, levando à produção de citocinas inflamatórias.



Fonte: Próprio autor, adaptado de ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015.

Além da liberação de citocinas, a ativação do inflamossoma NLRP3 pode induzir à piroptose, um tipo de morte celular programada que amplifica a resposta inflamatória (HAMARSHEH; ZEISER, 2020; AGRAWAL *et al.*, 2025). Esse mecanismo é essencial na defesa contra infecções, mas sua desregulação pode estar associada a doenças inflamatórias crônicas e ao câncer (HAMARSHEH; ZEISER, 2020).

O papel do NLRP3 no câncer é complexo e ambíguo. Em alguns casos, sua ativação promove um ambiente inflamatório favorável à proliferação celular, metástase e imunossupressão, contribuindo para a progressão tumoral (HAMARSHEH; ZEISER, 2020). Em tumores como melanoma e câncer de mama, sua atividade está associada a um aumento da agressividade tumoral (HAMARSHEH; ZEISER, 2020; SAFI *et al.*, 2024; CHEN *et al.*, 2025).

Por outro lado, há evidências de que o NLRP3 pode ter um efeito protetor, auxiliando o sistema imunológico na eliminação de células cancerígenas. Em tipos de câncer como o colorretal, sua ativação pode estimular respostas imunológicas antitumorais, limitando o crescimento do tumor (HAMARSHEH; ZEISER, 2020; AGRAWAL *et al.*, 2025; VALENTI *et al.*, 2025).

Diante desse efeito duplo, a regulação do inflamossoma NLRP3 se mostra uma estratégia promissora para terapias contra o câncer, seja por meio da inibição de sua ativação em tumores agressivos, reduzindo a inflamação associada ao câncer, ou pelo estímulo de sua função imunológica em determinados tipos tumorais (MADDEN *et al.*, 2025). Estudos vêm explorando moduladores terapêuticos, como inibidores seletivos do inflamossoma, para ajustar a resposta inflamatória e melhorar as estratégias de combate ao câncer (HAMARSHEH; ZEISER, 2020).

#### **1.4 Regulação Epigenética e sua Influência na Oncogênese.**

O estudo dos mecanismos epigenéticos tem sido essencial para a compreensão do câncer, proporcionando novas perspectivas para o diagnóstico e tratamento de diversas doenças (MANÁVOLA *et al.*, 2020; STRUB; BALLOTTI; BERTOLOTTO, 2020). Recentemente, pesquisas demonstraram o papel crucial da epigenética na regulação dos genes envolvidos no processo inflamatório, mostrando como modificações na expressão gênica podem influenciar

diretamente a progressão tumoral (MATT, 2018; OMDAL, 2020; CHENG *et al.*, 2020; EICHWALD, 2023).

No melanoma, diferentes mecanismos epigenéticos são observados, incluindo metilação aberrante do DNA, modificações de histonas, alterações em reguladores de cromatina e rearranjo de microRNAs (miRNAs) (MANÁVOLA *et al.*, 2020). Essas alterações desempenham um papel central na progressão tumoral, facilitando o escape do sistema imune, o surgimento de metástases e a resistência às terapias convencionais (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; MANÁVOLA *et al.*, 2020; CEREGHETTI *et al.*, 2024).

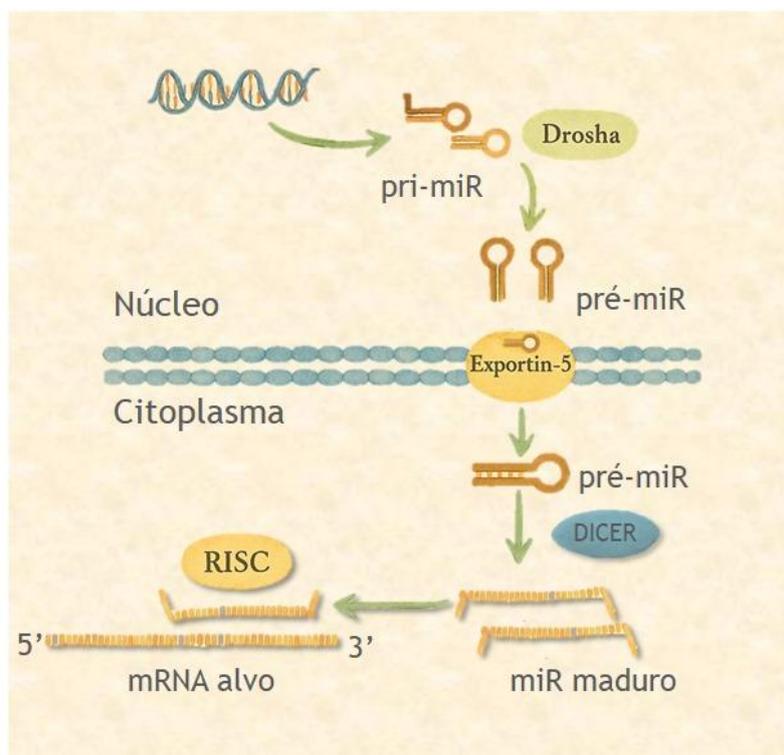
Os miRNAs têm emergido como moduladores epigenéticos essenciais, participando de um processo multifásico de síntese e maturação. Sua formação ocorre por meio de duas rotas: canônica e não canônica, sendo a primeira a via predominante (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006; JORGE *et al.*, 2021).

Na rota canônica (**Ilustr. 2**), os microRNAs primários (pri-miRNA) são transcritos a partir de sequências extensas de DNA (500-3000 nucleotídeos) pela RNA polimerase. No núcleo, a enzima Drosha, uma ribonuclease, cliva a estrutura em formato de haste-alça, originando o miRNA precursor (pre-miRNA) (~70 nt). Posteriormente, o pre-miRNA é transportado para o citoplasma através da proteína Exportina-5, onde sofre processamento pela enzima Dicer, gerando um miRNA maduro de fita única (~22 nt) (JORGE *et al.*, 2021).

O miRNA maduro se associa a proteínas do grupo Argonauta (AGO), formando o complexo de silenciamento RISC (RNA-induced silencing complex). Essa estrutura interage com moléculas de RNA mensageiro (mRNA), predominantemente na região 3' UTR, impedindo sua tradução e promovendo sua degradação (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006).

Por influenciarem processos biológicos como proliferação celular, diferenciação, migração, metabolismo e apoptose, os miRNAs estão diretamente envolvidos na oncogênese e são considerados ferramentas promissoras para diagnóstico e abordagens terapêuticas (JORGE *et al.*, 2021). Seu potencial na modulação da expressão gênica tem sido amplamente estudado como estratégia para intervenções farmacológicas inovadoras no tratamento do câncer (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006; SONG *et al.*, 2019).

## Ilustração 2: Biogênese Canônica dos microRNAs.



Fonte: Próprio autor, adaptado de SONG *et al.* 2019.

### 1.5 Função e Mecanismos dos miRNAs: miR-22 e miR-223.

Os miRNAs são moléculas de RNA não codificante que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente, atuando na repressão da tradução de RNA mensageiro (mRNA). Eles exercem funções essenciais em proliferação celular, diferenciação, apoptose e resposta inflamatória, sendo peças-chave na homeostase celular e no desenvolvimento tumoral (HOUSHMANDFAR *et al.*, 2021).

Entre os principais miRNAs associados ao câncer, o miR-22 se destaca por sua ação antitumoral, regulando genes envolvidos na progressão tumoral e na resposta inflamatória (BAUERNFEIND *et al.*, 2012). Sua expressão inibe genes pró-oncogenes, reduz a proliferação celular e bloqueia a metástase em diversos tipos de tumor (HOUSHMANDFAR *et al.*, 2021). Além disso, participa da modulação epigenética, influenciando na metilação do DNA e em alterações

de histonas, impactando diretamente na regulação gênica associada ao câncer (BAUERNFEIND *et al.*, 2012).

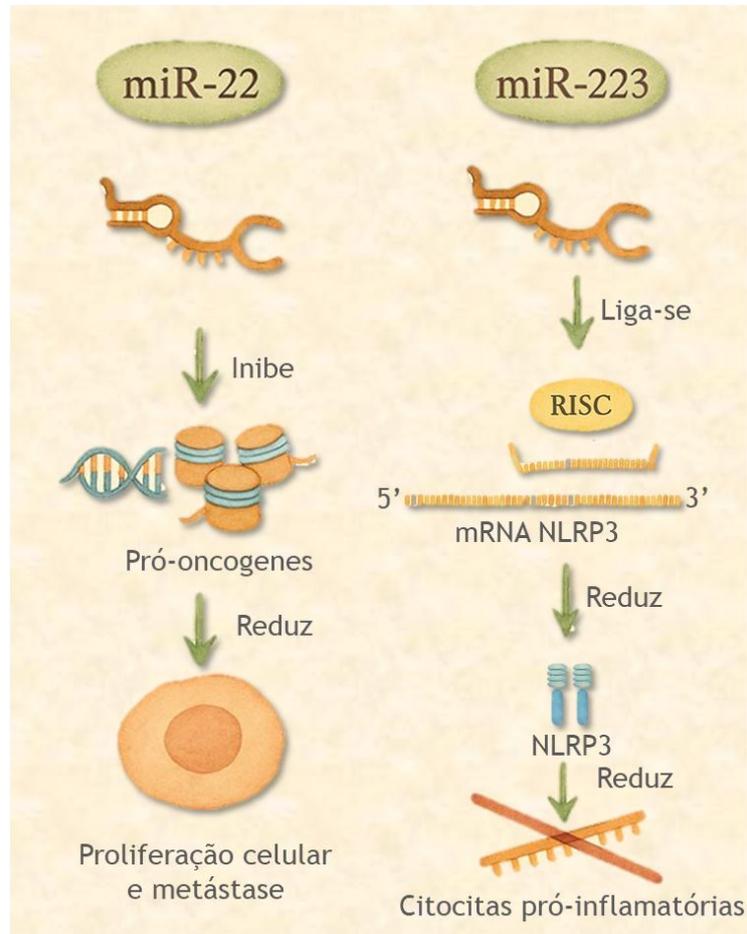
O miR-223, por sua vez, está fortemente ligado à imunidade inata, sendo expresso principalmente em células mieloides (HOUSHMANDFAR *et al.*, 2021). Esse miRNA tem uma relação direta com a regulação do inflamossoma NLRP3, suprimindo sua expressão por meio de um sítio de ligação conservado na região 3' UTR do gene NLRP3, o que reduz sua atividade inflamatória (BAUERNFEIND *et al.*, 2012).

A ativação do inflamossoma NLRP3 no câncer pode ser ambígua, tendo efeitos promotores, pois em alguns casos, sua ativação induz um ambiente inflamatório favorável à proliferação celular e metástase (BAUERNFEIND *et al.*, 2012) ou inibitórios, uma vez que em outros tipos de câncer, pode estimular respostas imunológicas antitumorais, ajudando o organismo a eliminar células neoplásicas (HOUSHMANDFAR *et al.*, 2021).

O miR-223 desempenha um papel central na regulação do inflamossoma NLRP3, reduzindo sua atividade e, conseqüentemente, controlando a produção de citocinas inflamatórias. Isso sugere que a modulação positiva do miR-223 pode representar uma estratégia terapêutica promissora para limitar a inflamação associada ao câncer e aprimorar a resposta imunológica contra tumores (BAUERNFEIND *et al.*, 2012).

Dessa forma, os miRNAs miR-22 e miR-223 exercem papéis fundamentais na regulação epigenética, progressão tumoral e resposta inflamatória (**Ilustr.3**), atuando como moduladores do microambiente tumoral e potenciais alvos terapêuticos na oncologia.

**Ilustração 3:** Atuação dos miRNAs: miR-22 e miR-223 no câncer e no complexo inflamossoma NLRP3.



Fonte: Próprio autor.

## 1.6 *Viscum album* e Modulação Epigenética no Câncer

Nos últimos anos, a imunoterapia revolucionou o tratamento do melanoma, permitindo um aumento da sobrevida de pacientes de apenas 6-9 meses para cerca de 5 anos (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020; AHMED; QADIR; GHAFOOR, 2020; STRUB; BALLOTTI; BERTOLOTTO, 2020; HUO *et al.*, 2025; PEREIRA *et al.*, 2025). Entretanto, apesar de sua alta eficácia, os custos elevados restringem o acesso a esses tratamentos, além de não serem uma realidade na prática clínica veterinária.

Diante dessas limitações, cresce o interesse por medicina complementar e integrativa, que busca melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir os

efeitos adversos das terapias convencionais (KANHERKAR *et al.*, 2017; SHARMA; SHARMA, 2019; BAGOT *et al.*, 2021). Esse modelo terapêutico vem sendo incorporado ao atendimento médico e veterinário, com crescente adesão de pacientes e tutores de animais domésticos que buscam alternativas para complementar os resultados da oncologia tradicional (KELLER; VANWESENBEECK; DECLOEDT, 2022).

Um dos compostos de maior relevância na oncologia integrativa é o *Viscum album* (Va), que vem sendo utilizado há mais de 100 anos como terapia adjuvante no tratamento de tumores, devido às suas propriedades antitumorais e imunomoduladoras (BONAMIN; DE CARVALHO; WAISSE, 2017; FELENDÁ; TUREK; STINTZING, 2019; SCHAD *et al.*, 2024).

Trata-se de uma planta semiparasita de árvores decíduas e perenes da Europa e da Ásia, que se forma como um arbusto nas copas dessas árvores e, após sua floração, produz frutos que são como bagas brancas de conteúdo altamente tóxico, quando ingeridas de forma direta (NICOLETTI, 2023).

O preparo dos extratos de Va segue rígidos padrões antroposóficos e homeopáticos, que levam em consideração a árvore hospedeira e a época do ano ideal para a colheita (FELENDÁ; TUREK; STINTZING, 2019; NICOLETTI, 2023).

Dentre as principais espécies de hospedeiros de Va estão as árvores: *Malus domestica*, *Quercus sp.*, *Ulmus sp.*, *Pinus sylvestris* e *Abies alba*. Pesquisas com *Viscum* parasita de *Malus domestica*, *Quercus sp.* e *Abies alba* colhido no verão evidenciam maior índice de viscotoxinas na sua composição química e maior mortalidade sobre culturas de células tumorais (HOLANDINO *et al.*, 2018; HOLANDINO *et al.*, 2020; NICOLETTI, 2023).

Além dos seus efeitos antitumorais, extratos de Va mostraram efeito sinérgico com a Cisplatina, evidenciando o potencial da terapia combinada para reduzir doses do quimioterápico e minimizar efeitos adversos (LYU; MESHESHA; HONG, 2025).

Com o intuito de reduzir possíveis efeitos colaterais decorrentes dos compostos concentrados nos extratos, a ultradiluição de substâncias tem sido utilizada, sendo a base da Homeopatia, que é uma abordagem terapêutica desenvolvida há aproximadamente 200 anos pelo médico Samuel Hahnemann (SHARMA; SHARMA, 2019; FELENDÁ; TUREK; STINTZING, 2019).

As formas ultradiluídas dos medicamentos homeopáticos podem ser preparadas de acordo com três tipos principais de escalas: decimal (X), centesimal (CH), e cinquenta-milesimal (LM), que consistem, respectivamente, nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:50.000 (SHARMA; SHARMA, 2019; FELENDÁ; TUREK; STINTZING, 2019).

Estudos mostram que o uso de medicações homeopáticas nos casos de câncer tem contribuído significativamente com o bem-estar dos pacientes, uma vez que auxilia na modulação do quadro de fadiga causada por neoplasias (BAGOT; LEGRAND; THEUNISSEN, 2021; LYU; MESHESHA; HONG, 2025).

Além disso, pesquisas mostram que homeopáticas puderam desencadear modificações epigenéticas e alterações nos perfis de expressão de genes associados à carcinogênese em células HeLa *in vitro* (SAHA; ROY; KHUDA-BUKHSH, 2015). Semelhantemente, pesquisas com Condurango 30CH, demonstraram modificações epigenéticas no câncer de pulmão, por meio da modulação da hipermetilação do DNA (KHUDA-BUKHSH; SIKDAR, 2015). Com isso, estudos das alterações epigenéticas induzidas pelo uso de ultradiluições nos quadros neoplásicos podem fornecer informações relevantes para a compreensão e descoberta de terapias que possam oferecer melhor qualidade de vida, com pouco ou nenhum efeito colateral (KHUDA-BUKHSH; SIKDAR, 2015).

Estudos do grupo demonstraram que ultradiluições de Va podem estar modulando o metabolismo celular, o estresse oxidativo e o perfil de citocinas inflamatórias, *in vitro* (BALTUILLE, 2021). Estas ultradiluições *in vivo* promoveram, também, melhora no estado geral, na qualidade e no tempo de vida dos animais tratados (DA SILVA, 2023).

Dessa forma, considerando que medicamentos ultradiluídos são capazes de induzir alterações epigenéticas em células tumorais, o estudo da ativação e regulação do complexo inflamossoma NLRP3 pela via epigenética, pode fornecer informações relevantes para a compreensão da ação destes medicamentos no modelo de melanoma murino.

Apesar dos avanços na compreensão do inflamossoma NLRP3 e das propriedades antitumorais de *Viscum album*, há uma lacuna significativa na literatura quanto à investigação de seus efeitos em preparações ultradiluídas sobre essa via inflamatória, especialmente no contexto tumoral. Poucos estudos

abordam como essas formulações modulam mecanismos moleculares como a biogênese de miRNAs, a expressão do NLRP3 e a produção de citocinas inflamatórias em células de melanoma.

Além disso, é importante destacar que as diferentes escalas homeopáticas utilizadas neste estudo (X, CH e LM) não diferem apenas em grau de diluição, mas potencialmente também em tipo e profundidade de ação biológica. Por exemplo, as preparações LM têm sido associadas a efeitos mais sutis e duradouros sobre a regulação celular (FELENDÁ *et al.*, 2019), o que pode se refletir em padrões distintos de resposta celular.

Diante disso, a presente pesquisa busca investigar se e como preparações ultradiluídas de *Viscum album* influenciam a ativação do inflamossoma NLRP3 e sua regulação epigenética em células de melanoma murino. Tal abordagem visa contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação dessas formulações e avaliar seu potencial como estratégia terapêutica complementar na oncologia humana e veterinária.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 8ª edição. **Elsevier Editora**, 2015.
- AHMED, B.; QADIR, M. I.; GHAFOR, S. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, 2020.
- ANGERER, H. *et al.* Homeopathic Cancer Therapy Research from 2018 to 2022: A Review of the Literature. **ResearchGate**, 2023.
- 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.
- BAILLIF, S.; NAHON-ESTEVE, S.; PACE-LOSCOS, T.; PAGÈS, G.; DUFIES, M. Aqueous humor mediator levels as biomarkers of anti-VEGF response in age-related macular degeneration. **Cytokine**. 2025.
- BALTUILLE, P. I. Avaliação *in vitro* do efeito de preparações homeopáticas de *Viscum album* sobre células de melanoma murino. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) – Faculdade de Medicina Veterinária, **Universidade Paulista**, São Paulo, 2021.
- BAUERNFEIND, F. G. *et al.* Cutting edge: NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **The Journal of Immunology**, 2009.

BELLAVITE, P. *et al.* High-dilution effects revisited. Pharmacodynamic mechanisms. **Homeopathy**. 2014.

BONAMIN, L. V.; DE CARVALHO, A. C.; WAISSE, S. *Viscum album* (L.) in experimental animal tumors: A meta-analysis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 13, n. 6, p. 2723-2740, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)**. Estimativa 2019: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

CARRILHO, M. C. Tumores orais sólidos em cães: aspectos epidemiológicos e etiológicos. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – **Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2024.

CEREGHETTI, A. S. P. *et al.* DNA Methyltransferase Inhibition Upregulates the Costimulatory Molecule ICAM-1 and the Immunogenic Phenotype of Melanoma Cells. **JID Innov**, 2024.

CHEN, J. *et al.* Circulating cytokine associations with clinical outcomes in melanoma patients treated with combination nivolumab plus ipilimumab. **Oncoimmunology**. 2025.

CHENG, R. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. **International Journal of Oral Science**, 2020.

CHIVITE-LACABA, M. *et al.* Delineation of monocytic and early-stage myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of patients with hepatocarcinoma. **Int J Cancer**. 2025.

ĆWIKLIŃSKA-DWORAKOWSKA, M. *et al.* Preliminary results suggest the potential of evaluating combined bFGF and TNF- $\beta$  concentrations for differentiating papillary thyroid cancer from benign nodular goiter. **Sci Rep**. 2025.

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

DANG, C. *et al.* Causal relationship between inflammatory factors and gynecological cancer: a Bayesian Mendelian randomization study. **Sci Rep**. 2024.

DAVANZO, G. G. Inflamossoma NLRP3 como um possível mecanismo na mediação de déficits funcionais na hipertensão: efeitos do treinamento aeróbio. Dissertação (Mestrado) – **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2017.

DAVIS, L. E.; SHALIN, S. C.; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy**, 2019.

DEHNE, E. M.; HASENBERG, T.; MARX, U. The ascendance of microphysiological systems to solve the drug testing dilemma. **Future Science**, 2017.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R. *et al.* Interleukin-12 treatment reduces tumor growth and modulates the expression of CASKA and MIR-203 in athymic mice bearing tumors induced by the HGC-27 gastric cancer cell line. **Pathol Res Pract**. 2024.

DEMANGEAT J L. Gas nanobubbles and aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization, **Homeopathy**. 2015.

DENG, J. *et al.* N7-methylguanosine methylation-related regulator genes as biological markers in predicting prognosis for melanoma. **Sci Rep**, 2022.

DIOS-FIGUEROA, G. T. *et al.* 3D cell culture models in covid-19 times: a review of 3D technologies to understand and accelerate therapeutic drug discovery. **Biomedicines**, 2021.

EICHWALD, T. *et al.* Anti-Inflammatory Effect of Caffeine on Muscle under Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **Antioxidants**, 2023.

FELENDÁ, J. E.; TUREK, C.; STINTZING, F. C. Antiproliferative potential from aqueous *Viscum album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and puorhionin on human cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 236, p. 100-107, 2019.

FILIPIAK-DULIBAN, A. *et al.* Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models. **Int. J. Mol. Sci**, 2022.

GHALWASH, D.; AMMAR, A.; ABOU-BAKR, A.; DIAB, A.H.; EL-GAWISH, A. Validation of salivary proteomic biomarkers for early detection of oral cancer in the Egyptian population. **Future Sci OA**. 2025.

GILLARD, M. *et al.* Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment Cell Melanoma Res**, 2014.

GUEDES, J. R. P.; BONAMIN, L. V.; CAPELOZZI, V. L. Water-Related Mechanisms Proposed for Storing and Transmitting Homeopathic Information: Putative Links with Biological Responses. **Homeopathy**. 2018.

HAMARSHEH, S.; ZEISER, R.. NLRP3 Inflammasome Activation in Cancer: A Double-Edged Sword. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

HOLANDINO, C. *et al.* Phytochemical analysis and in vitro antiproliferative activity of *Viscum album* ethanolic extracts. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, 2020.

HOLANDINO, C. *et al.* Viscum album homeopathic tinctures: phytochemical profile and antiproliferative activity. **International Journal of High Dilution Research**, 2018.

HOUSHMANDFAR, N. *et al.* Emerging roles of miR-223 and miR-22 in inflammation and cancer: From molecular targets to therapeutic potential. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

HÜLSENBUSCH, J. *et al.* Therapeutic approaches to modulate the inflammasome in cancer: A translational perspective. **Cancers**, 2023.

JORGE, A. L. *et al.* MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. **Einstein**, 2021.

KANHERKAR, R. R. *et al.* Epigenetic Mechanisms of Integrative Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017

KELLER, P.; VANWESENBEECK, I.; DECLOEDT, A. Surveying dog owners' use and understanding of, and communication with veterinarians about, complementary and alternative veterinary medicine. **VetRecord**, 2022.

KHUDA-BUKHSH, A. R.; SIKDAR, S. Condurango 30C Induces Epigenetic Modification of Lung Cancer-specific Tumour Suppressor Genes via Demethylation. **Forsch Komplementmed**, 2015.

KINRA, M. *et al.* The interplay between NLRP3 inflammasome and cancer: Potential therapeutic implications. **Current Opinion in Pharmacology**, 2023.

KINRA, M. *et al.* Involvement of NLRP3 inflammasome pathway in the protective mechanisms of ferulic acid and p-coumaric acid in LPS-induced sickness behavior and neuroinflammation in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2024.

KLICKS, J. *et al.* A novel spheroid-based co-culture model mimics loss of keratinocyte differentiation, melanoma cell invasion, and drug-induced selection of ABCB5-expressing cells. **BMC Cancer**, 2019.

KODI, T. *et al.* Neuroprotective Effects of Metformin and Berberine in Lipopolysaccharide-Induced Sickness-Like Behaviour in Mice. **Adv Pharmacol Pharm Sci**, 2024.

KONSMAN, J. P. So Many Faces, Phases, and Facets, Sickness Behavior Beyond Disciplines. **Frontiers in Psychiatry**, 2021.

KOPEC, A. K. *et al.*, Microphysiological systems in early stage drug development: Perspectives on current applications and future impact. **The Journal of Toxicological Sciences**. v. 46 (3), p. 99-114, 2021.

LA'AH, A.S, *et al.* Neutrophils Recruited by NKX2-1 Suppression via Activation of CXCLs/CXCR2 Axis Promote Lung Adenocarcinoma Progression. **Adv Sci (Weinh)**. 2024.

LIMA, A. L. *et al.* Melanomas em cães no Sertão do Nordeste do Brasil-epidemiologia, fatores de risco e achados clinicopatológicos. **Acta sci. vet.(Impr.)**, p. Pub. 1878-Pub. 1878, 2022.

LIU, A., *et al.* CXCL1 and CXCL8: Reliable and feasible biomarkers differentiating intrapulmonary metastasis from multiple primary neoplasms in non-small cell lung cancers. **Cancer Biomarkers**. 2025.

MADDEN, G.R.; PREISSNER, R.; PREISSNER, S.; PETRI, W.A. Anti-interleukin-23 treatment linked to improved *Clostridioides difficile* infection survival. **Gut Microbes**. 2025.

MANÁVOLA, F. *et al.* Extracellular Vesicles and Epigenetic Modifications Are Hallmarks of Melanoma Progression. **Int. J. Mol. Sci**, 2020.

MARCONI, A. *et al.* Progress in melanoma modelling in vitro. **Experimental Dermatology**, 2018.

MATT, S. M. Inhibition of DNA Methylation With Zebularine Alters Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behavior and Neuroinflammation in Mice. **Front Neurosci**, 2018.

OMDAL, R. The biological basis of chronic fatigue: neuroinflammation and innate immunity. **Curr Opin Neurol**, 2020.

PEREIRA, T. G. G. *et al.* Epidemiologia dos tumores de pele melanoma e não melanoma: uma comparação de dados de incidência, mortalidade e opções terapêuticas. **Revista Delos**, [S. l.], v. 18, n. 63, p. e3620, 2025.

REBECA, V. W.; SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. **Nat Commun**, 2020.

RICARTE, F.; MARQUES, J. C.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102-1107, 2006.

SAFI, M. *et al.* Inflammasome signaling in cancer: A double-edged sword. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 25, n. 15, p. 8191, 2024.

SAFI, S. *et al.* Low tumor interleukin-1 $\beta$  expression predicts a limited effect of adjuvant platinum-based chemotherapy for patients with completely resected lung adenocarcinoma: An identification and validation study. **Pulmonology**. 2025.

SAHA, S. K.; ROY, S.; KHUDA-BUKHSH, A. R., Ultra-highly diluted plant extracts of *Hydrastis canadensis* and *Marsdenia condurango* induce epigenetic

modifications and alter gene expression profiles in HeLa cells in vitro. **Journal of Integrative Medicine**, 2015.

SAINI, S.; GADET, J.A.M.A.; FREEMAN, G.J.; CHIOCCA, E.A.; MINEO, M. Improving IL12 immunotherapy in glioblastoma by targeting the long noncoding RNA INCR1. **J Neurooncol**. 2025.

SCHAD, F. *et al.* Patients with Advanced or Metastasised Non-Small-Cell Lung Cancer with *Viscum album* L. Therapy in Addition to PD-1/PD-L1 Blockade: A Real-World Data Study. **Cancers (Basel)**, 2024.

SCHMITT, O. *et al.* Regular Positive Human Contacts Do Not Improve Pigs' Response to a Lipopolysaccharide Immune Challenge. **Neuroimmunomodulation**, 2025.

SHARMA, B.; SHARMA, P. K. Homeopathy and Cancer: A Review. **Journal of Applied Dental and Medical Sciences**, v. 5, p. 1, 2019.

SHEN, J.; WANG, M.; LI, F.; YAN, H.; ZHOU, J. Homeodomain-containing gene 10 contributed to breast cancer malignant behaviors by activating Interleukin-6/Janus kinase 2/Signal transducer and activator of transcription 3 pathway. **Bioengineered**. 2022.

SOMOVA, M. *et al.* Integrating tumor and healthy epithelium in a micro-physiology multi-compartment approach to study renal cell carcinoma pathophysiology. **Sci Rep**. 2024.

SONG, Qian; AN, Quanlin; NIU, Bing; LU, Xiaoling; ZHANG, Ning; CAO, Xin. Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism. **Journal of Oncology**, v. 2019.

STRUB, T.; BALLOTTI, R.; BERTOLOTTO, C. The "ART" of Epigenetics in Melanoma: From histone "Alterations, to Resistance and Therapies" **Theranostics**, 2020.

TARONE, L. *et al.* Naturally occurring cancers in pet dogs as pre-clinical models for cancer immunotherapy. **Cancer Immunol Immunother**, 2019.

VALENCIA, B.M. *et al.* The severity of the pathogen-induced acute sickness response is affected by polymorphisms in genes of the NLRP3 inflammasome pathway. **Brain Behav Immun**. 2021.

VALENCIA, D. A. *et al.* The NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases: A target with therapeutic potential. **Cancers**, Basel, v. 13, n. 10, p. 2297, 2021.

VALENTI, M. *et al.* Safety of interleukin inhibitors in patients with plaque psoriasis and history of neoplasms: a multicenter retrospective study - IL PSO (Italian landscape psoriasis). **J Dermatolog Treat**. 2025.

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

VENTURA, L. *et al.* Involvement of NLRP3 inflammasome in schizophrenia-like behaviour in young animals after maternal immune activation. **Acta Neuropsychiatr.** 2020.

WANG, X. *et al.* miR-223-3p inhibits melanoma cell proliferation and migration through targeting NLRP3. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,** 2021.

WASSENHOVEN, M. V. *et al.* Characterisation of Aqueous Ultra-high Homeopathic Potencies: Nanoparticle Tracking Analysis. **Homeopathy.** 2024.

WINKLER, C. *et al.* Homeopathy in supportive cancer care: An update of evidence and recommendations. **Complementary Therapies in Medicine,** 2023.

2. **ARTIGO** – Periódico para submissão: Journal of Integrative Medicine.

**EFEITOS DAS PREPARAÇÕES ULTRADILUÍDAS DE *Viscum album* NA ATIVAÇÃO DO INFLAMOSSOMA NLRP3 NAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.**

**Priscila Inhauser Baltuille do Prado<sup>1</sup>, Carla Holandino<sup>2,3</sup>, Stephan Baumgartner<sup>3,4,5</sup>, Cristiane Morais<sup>1</sup>, Leoni Villano Bonamin<sup>1</sup>, Rodrigo Augusto Foganholi da Silva<sup>1</sup> and Elizabeth Cristina Pérez Hurtado<sup>1</sup>**

1 Experimental and Environmental Pathology, Universidade Paulista, Brazil.

2 Pharmacy College, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

3 Society for Cancer Research, Hiscia Institute, Arlesheim, Switzerland.

4 Institute of Integrative Medicine, University of Witten/Herdecke, Germany.

5 Institute of Complementary and Integrative Medicine, University of Bern, Switzerland.

**Correspondence to:** elizabeth.hurtado@docente.unip.br

**Resumo**

O *Viscum album* (Va) vem sendo utilizado como tratamento complementar para o câncer há mais de 100 anos, da mesma forma que medicações homeopáticas de modo geral. Embora não haja literatura extensa sobre as ultradiluições de Va, estudos do grupo com essas medicações no modelo de melanoma murino demonstraram que, *in vitro*, houve modulação do metabolismo celular, do estresse oxidativo e do perfil de citocinas inflamatórias; e *in vivo*, a melhora do bem-estar de camundongos com melanoma foi observada; por isso o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de ultradiluições de Va na ativação do inflamossoma NLRP3, que está fortemente relacionado com a indução de neuroinflamação que ocasiona alterações de comportamento que comprometem a qualidade de vida. Os resultados mostraram que VaAa 12X promoveu aumento de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  após 24h, sugerindo possível ativação do inflamossoma. As tinturas-mãe, em especial VaAa, induziram resposta inflamatória intensa após 1h, com aumento de diversas citocinas, como IL-6, IL-12p40/p70 e IL-18. A

expressão de NLRP3 foi modulada de forma tempo-dependente, com redução inicial (1 hora) por VaQr 5LM e aumento tardio (24 horas) com VaAa 5LM. Ainda, observou-se aumento da expressão de miR-223 por VaQr 200CH e VaAa 200CH, e modulação de componentes da via de biogênese de miRNAs (Drosha, Dicer, Xpo5). Os dados indicam que as preparações ultradiluídas de *Viscum album* apresentam potencial imunomodulador e epigenético, capazes de interferir em vias críticas da inflamação. Tais achados contribuem para o entendimento dos mecanismos moleculares em oncologia integrativa e reforçam o potencial dessas formulações como estratégias terapêuticas adjuvantes no tratamento do câncer.

**Palavras-chave:** câncer de pele, mistletoe, homeopatia, complexo inflamossoma, microRNAs.

## INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia maligna, potencialmente letal com incidência mundial, responsável pela maioria das mortes por câncer de pele, ainda que represente menos de 5% destas (VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020; AHMED; QADIR; GHAFOR, 2020; STRUB; BALLOTTI; BERTOLOTTO, 2020). Quando o diagnóstico é feito de maneira precoce, a cirurgia é suficiente para levar à remissão, porém apresenta alto potencial metastático, o que dificulta o tratamento e torna o prognóstico ruim (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020; STRUB; BALLOTTI; BERTOLOTTO, 2020).

Na clínica veterinária, os melanomas são comuns em cães (GILLARD *et al.*, 2014; VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020), ocorrendo mais predominantemente na forma oral (62%), seguida da cutânea (27%) (GILLARD *et al.*, 2014; VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020). Nos gatos o melanoma é raro em qualquer região, embora desenvolvam melanoma ocular mais frequentemente do que cutâneo, nesses casos a ocorrência de metástase é de 63% (VAN DER WEYDEN *et al.*, 2020).

Em geral, sejam animais ou humanos, a doença neoplásica leva a alterações de comportamento (OMDAL, 2020). Esta condição, conhecida como “comportamento doentio”, é algo que vêm sendo estudada de maneira multi e

interdisciplinar, e traz grande impacto à qualidade de vida de pacientes humanos e animais, bem como aos seus cuidadores, devido a suas manifestações, como a redução do apetite, retraimento social e a fadiga crônica (OMDAL, 2020; KONSMAN, 2021).

Pesquisas mostram o papel das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 no desencadeamento e manutenção do comportamento doentio (OMDAL, 2020; KONSMAN, 2021). Estas interleucinas, para terem seus efeitos deflagrados, necessitam serem ativadas por mediadores intracelulares, que formam o complexo inflamossoma, e que é composto por NLRP3, ASC e Caspase-1 (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015). Estudos mostram o papel crucial dos mecanismos epigenéticos na regulação dos genes envolvidos no processo inflamatório e que estão contribuindo para as manifestações do comportamento doentio (CHENG et al, 2020; EICHWALD, 2023MATT, 2018; OMDAL, 2020).

Como uma modalidade de terapia integrativa, extratos de *Viscum album* (Va) vêm sendo utilizados no tratamento adjuvante em casos oncológicos há aproximadamente 100 anos, devido suas propriedades antitumorais e imunomoduladoras (BONAMIN; DE CARVALHO; WAISSE, 2017; FELEND; TUREK; STINTZING, 2019). O preparo destes extratos de Va segue rígidos padrões antroposóficos, que levam em consideração a árvore hospedeira e a época do ano ideal para a colheita (FELEND; TUREK; STINTZING, 2019). Dentre as principais espécies de hospedeiros de Va estão as árvores: *Malus domestica*, *Quercus sp.*, *Ulmus sp.*, *Pinus sylvestris* e *Abies alba*. Pesquisas com *Viscum* parasita de *Malus domestica*, *Quercus sp.* e *Abies alba* colhido no verão evidenciaram maior índice de viscotoxinas na sua composição química e maior mortalidade sobre culturas de células tumorais (HOLANDINO et al., 2018; HOLANDINO et al., 2020).

Com o intuito de eliminar possíveis efeitos colaterais associados à concentração dos compostos presentes nos extratos, a ultradiluição de substâncias é empregada. Este procedimento é a base da Homeopatia, que consiste em uma modalidade terapêutica desenvolvida há cerca de 200 anos pelo médico alemão Samuel Hahnemann. As formas ultradiluídas dos medicamentos homeopáticos podem ser preparadas de acordo com três tipos principais de escalas: decimal (X), centesimal (CH), e cinquenta-milesimal (LM). (FELEND; TUREK; STINTZING, 2019; SHARMA; SHARMA, 2019).

Estudos mostram que o uso de medicações homeopáticas no câncer, tem contribuído significativamente com o bem-estar dos pacientes, uma vez que auxilia na modulação do quadro de fadiga (BAGOT; LEGRAND; THEUNISSEN, 2021). Além de desencadearem modificações epigenéticas em estudo *in vitro* (KHUDA-BUKHSH; SIKDAR, 2015; SAHA; ROY; KHUDA-BUKHSH, 2015). Com isso, estudos dos efeitos epigenéticos de ultradiluições nos quadros neoplásicos, podem ser promissores para a compreensão e descoberta de terapias que possam oferecer melhor qualidade de vida, com pouco ou nenhum efeito colateral (KHUDA-BUKHSH; SIKDAR, 2015).

Desta forma, considerando que medicamentos homeopáticos são capazes de induzir alterações epigenéticas nas células tumorais o estudo do perfil epigenético dos genes associados ao processo inflamatório, nas células de melanoma antes e após tratamento com ultradiluições de Va, podem fornecer informações relevantes para a compreensão dos mecanismos de ação destes medicamentos no modelo de melanoma murino.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

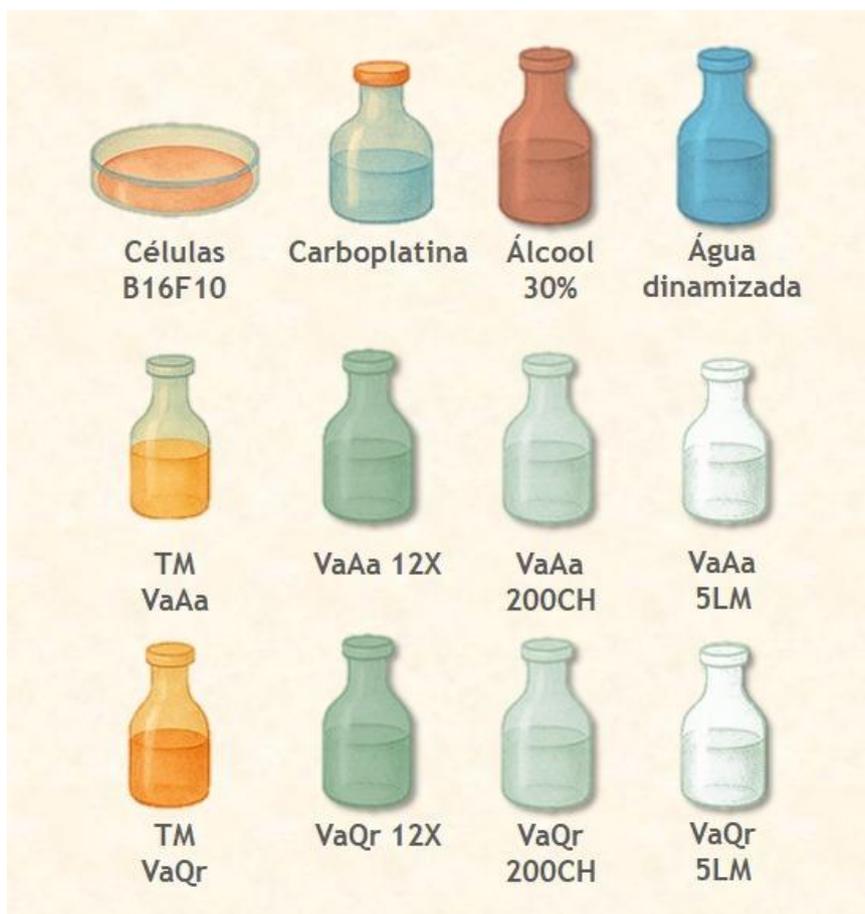
### **Medicamentos e veículos**

As tinturas-mães (TMs) de Va utilizadas foram disponibilizadas gentilmente pela Profa. Dra. Carla Holandino da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), para estudos prévios do grupo. Estas TMs foram preparadas conforme a farmacopeia homeopática brasileira, a partir de plantas colhidas das árvores hospedeiras *Quercus robur* (VaQr) e *Abies alba* (VaAa), nas estações do verão e do inverno suíço e foram encaminhadas para a farmácia homeopática HN Cristiano, em São Paulo, para obtenção das ultradiluições homeopáticas. As TMs e ultradiluições de Va que demonstraram potencial efeito citotóxico em estudos anteriores do grupo, tanto *in vitro* (BALTUILLE, 2021) quanto *in vivo* (DA SILVA 2023), foram novamente consideradas neste estudo.

Portanto, os tratamentos utilizados foram: TM VaAa e TM VaQr, ambas de verão, e suas diluições: 12X, 200CH e 5LM. Além disso, as células foram tratadas com os veículos (água dinamizada – ultradiluições; álcool 30% não dinamizado – tinturas) e com o quimioterápico carboplatina (B-platin – Blausiegel®) na concentração de 10%. Como controle negativo, as células

B16F10 foram mantidas somente com meio completo nos períodos correspondentes sem adição de nenhum tratamento; totalizando assim 12 grupos, os quais não foram cegados para a realização dos experimentos (**Ilustr. 4**).

**Ilustração 4:** Representação ilustrativa dos 12 grupos utilizados.



Fonte: Próprio autor.

### **Cultura celular.**

A linhagem de células de melanoma murino B16F10 foi cultivada em garrafas de cultura com meio completo contendo: meio 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), em incubadora (Thermo Fisher) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade relativa. Para coleta, as células foram submetidas a breve exposição à tripsina (Thermo Fisher)

e inativação com meio completo. Para os ensaios, foram utilizadas placas de 6 poços, com a concentração de  $8 \times 10^4$  células por poço.

#### **Viabilidade celular pelo método de exclusão por *Trypan blue*.**

Para contagem e determinação da viabilidade celular antes dos ensaios, o método de exclusão por *Trypan blue* (Tb) foi utilizado. Para isto, 10 uL de suspensão celular foram adicionados a 10 uL do corante Tb (diluição 1:2); após homogeneização, 10 uL desta solução foram colocados na câmara de Neubauer para quantificação das células vivas (não coradas) e mortas (coradas). Para a realização dos ensaios, culturas celulares com viabilidade acima de 90% foram utilizadas.

#### **Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias por citometria de fluxo.**

As concentrações de citocinas pró-inflamatórias (CXCL1, IL-18, IL-23, IL-12p70, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p40, IL-1 $\beta$ ) presentes no sobrenadante das culturas após os tratamentos foram determinadas usando o kit LEGENDplex™ *Mouse M1 Macrophage Panel (8-plex) V-bottom Plate* (BioLegend®, San Diego, CA – USA), conforme instruções do fabricante.

Para o ensaio, em cada poço da placa foram adicionados: 25 uL de tampão, 25 uL de cada amostra e, 25 uL do mix de beads de captura recobertas com anticorpos específicos para cada uma das 8 citocinas. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente com agitação constante, os poços foram lavados 2x com tampão de lavagem e, em seguida 25 uL de anticorpo de detecção foram adicionados e as amostras foram novamente incubadas por 1h à temperatura ambiente com agitação constante. Após incubação, sem lavagem dos poços, 25 uL de SA-PE (Streptavidin-phycoerythrin) foram adicionados para nova incubação por 30 min à temperatura ambiente com agitação. Em seguida, o sobrenadante foi removido por centrifugação curta, as amostras foram lavadas 1x e as beads foram ressuspensas em 150 uL de tampão de lavagem para aquisição no citômetro de fluxo BD ACCURI™ C6 (BD Biosciences), usando o template sugerido no kit, com aquisição mínima de 2400 eventos por amostra analisada. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análises

*BioLegend's LEGENDplex™ data analysis* (BioLegend®) disponibilizado gratuitamente no site do fornecedor: [biolegend.com/en-us/legendplex](http://biolegend.com/en-us/legendplex).

### **Extração de RNA total.**

Para investigar a expressão do gene NLRP3 e dos miRNAs (miR-22 e miR-223) envolvidos na regulação da sua expressão nas células de melanoma, o RNA total foi extraído utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização das células em 0,5 mL do reagente TRIzol®, a separação da fase aquosa foi realizada com a adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) e centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos devidamente identificados, sendo desprezada a fase precipitada. Em seguida, a precipitação do RNA foi realizada com a adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos. Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (pellet) foi lavado 2x com etanol 75%; após secagem, foi ressuscitado em 20 uL de água DEPEC e armazenado a -80°C. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ( $\geq 1,8$ ) e OD 260/230 ( $\geq 1,0$ ) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

### **Síntese de DNA complementar (cDNA).**

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada por meio da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total, previamente extraído e armazenado em ultrafreezer a -80°C. Para isso, foram utilizados 2 U da enzima transcriptase reversa do kit Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. A geração da primeira fita de cDNA ocorreu em uma reação com volume final de 20 uL, contendo 500 uM de dNTP, 25 g/mL de OLIGO dT, solução tampão 1X, 40 U de inibidor de RNase e 10 uM de DTT, com a ação da enzima Superscript II. Inicialmente, a combinação de RNA, água e iniciador passou por uma incubação a 65°C por 5 minutos, visando a abertura de eventuais estruturas secundárias. Depois, a reação prosseguiu a 50°C por 50 minutos, seguida de inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Ao

final, o cDNA sintetizado foi diluído para uma concentração de 100 ng/uL e armazenado a -20°C.

### Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR).

As reações foram realizadas com primers específicos (**Tab.1**) para expressão de NLRP3 e dos miRNAs: Drosha, Xpo5, Dicer, miR-22 e miR-223, e o gene RNU6 foi utilizado como controle endógeno. O volume final da reação foi de 10 uL, dos quais 5 uL de SYBR Green I Master, 4 uL do primer específico, 1 uL da amostra de cDNA sintetizado e q.s.p. de água Milli-Q RNase free.

A quantidade relativa de transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Para o cálculo da expressão, do valor de  $\Delta Ct$  foi obtido através da diferença entre o valor de Ct do gene endógeno (RNU6) menos o valor de Ct do gene alvo; então foi subtraída a média de Ct do grupo não tratado obtendo-se o  $\Delta\Delta Ct$ , ao qual foi aplicada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para resultar no valor final referente à expressão gênica.

**Tabela 1:** Condições de ciclagem e sequência dos *primers* utilizados para estudo da expressão gênica.

Gene	Iniciador	5'-3' Sequência	Condições de reação
NRU6	<i>Forward</i>	CTC GCT TCG GC AGC ACA	95°C - 10s.
	<i>Reverse</i>	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT	62°C - 10s. 72°C - 10s.
NLRP3	<i>Forward</i>	ATT ACC CGC CCG AGA AAG G	95°C - 10s.
	<i>Reverse</i>	TCG CAG CAA AGA TCC ACA CAG	62°C - 10s. 72°C - 10s.
Drosha	<i>Forward</i>	AAC AGT TCA ACC CCG AAG TG	95°C - 10s.
	<i>Reverse</i>	CTC TGA GCC AGC TTC TGC TT	62°C - 10s. 72°C - 10s.
Xpo5	<i>Forward</i>	TTC CTG ACT TCC GGC TTA GA	95°C - 10s.
	<i>Reverse</i>	TGG TTG ATG ACA TGC CAC TT	62°C - 10s. 72°C - 10s.
Dicer	<i>Forward</i>	TAA CTG GCA ATC CGA GG	95°C - 10s.
	<i>Reverse</i>	CCA TGG CAG ACA CAC TAC CTT	62°C - 10s. 72°C - 10s.
miR-22 PRE	<i>Forward</i>	ACC TGG CTG AGC CGC AGT	95°C - 10s.
	<i>Reverse</i>	GCC AGG GGC AGA GGG CA	64°C - 10s. 72°C - 10s.
miR-223 PRE	<i>Forward</i>	TCT GGC CAT CTG CAG TGT CAC GCT C	95°C - 10s.
	<i>Reverse</i>	CTG ATA GGC ATG AGC CAC ACT	66°C - 10s. 72°C - 10s.

Fonte: Próprio autor.

### **Análise estatística.**

Foram conduzidos três experimentos independentes (triplicata biológica), cada um contendo três amostras (triplicata experimental) para cada um dos 12 grupos. As três amostras de cada experimento foram agrupadas em um único pool, resultando em três pools no total – um para cada experimento. Para fins de análise estatística, cada pool foi considerado uma amostra, totalizando três amostras estatísticas.

Os testes de Normalidade (Shapiro-Wilk) e Homoscedasticidade (Levene) foram realizados para verificar se as distribuições das amostras eram ou não paramétricas. Com isso, as amostras foram consideradas não paramétricas e devido à baixa amostragem e grandes desvios padrão em alguns grupos, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós teste não corrigido de Dunnett. Análises e gráficos foram realizados usando *GraphPad Prism 8 Software* (GraphPad Prism, California, USA). Diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas, com  $\alpha = 0,05$ .

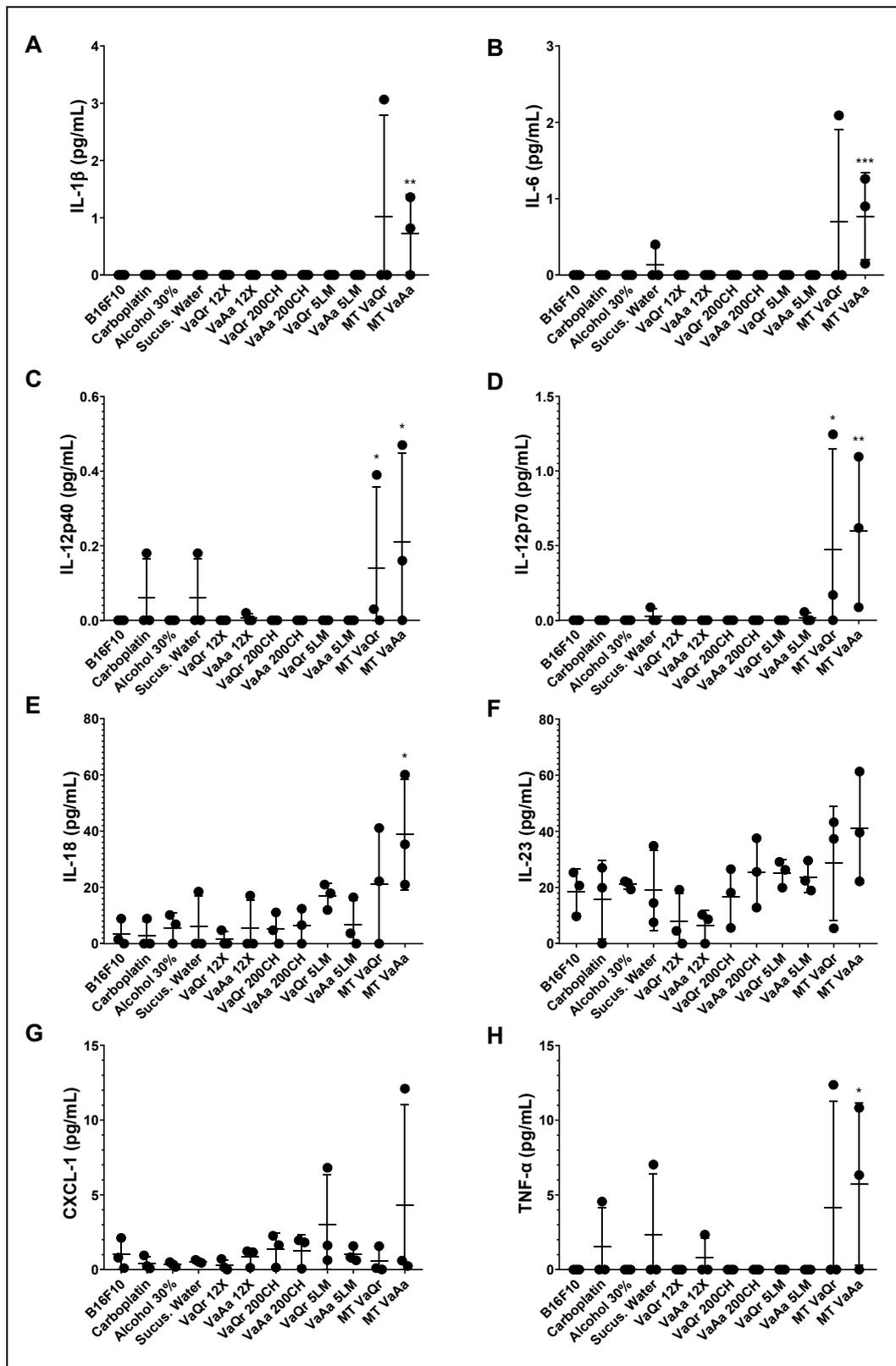
## **RESULTADOS**

### **Quantificação de Citocinas Inflamatórias.**

A quantificação de citocinas foi feita nos tempos de 1 e 24 horas, e avaliou oito citocinas inflamatórias de importância, sendo: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, IL-23, CXCL1 e TNF- $\alpha$ . De modo geral, as ultradiluições não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos tempos, com exceção de VaAa 12X que apresentou aumento de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) após 24 horas de tratamento.

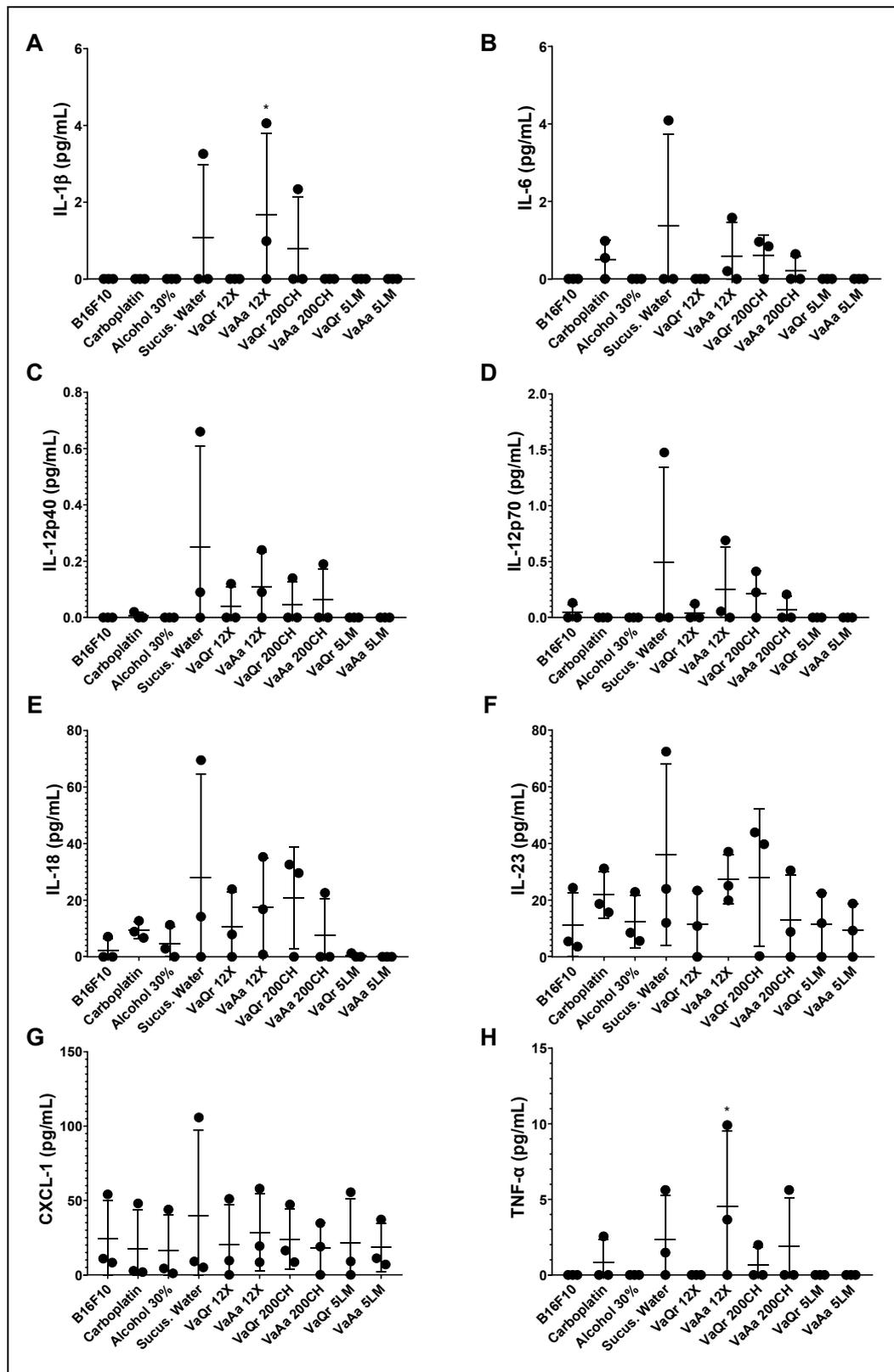
Já a TM de VaAa apresentou aumento das citocinas IL-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ), IL-6 ( $p < 0,001$ ), IL-12p40 ( $p < 0,05$ ), IL-12p70 ( $p < 0,01$ ), IL-18 ( $p < 0,05$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), e a TM de VaQr, que apresentou aumento somente de IL-12p40 ( $p < 0,05$ ) e IL-12p70 ( $p < 0,05$ ), ambas com 1 hora de tratamento (**Fig. 1**), sendo que estas TMs não foram testadas no tempo de 24 horas (**Fig. 2**) devido a sua já conhecida citotoxicidade que apresentou morte celular por necrose com apenas 1 hora, em estudos prévios (BALTUILLE, 2021),.

**Figura 1:** Produção de Citocinas inflamatórias nas células B16F10 com ou sem cada um dos tratamentos, após 1 hora.



Representação gráfica da produção de citocinas inflamatórias (**A.** IL-1b **B.** IL-6 **C.** IL-12p40 **D.** IL-12p70 **E.** IL-18 **F.** IL-23 **G.** CXCL1 **H.** TNF- $\alpha$ ) nas células B16F10 após 1 hora dos tratamentos respectivos. N = 3.  $\alpha$  = 0,05. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

**Figura 2:** Produção de Citocinas inflamatórias nas células B16F10 com ou sem cada um dos tratamentos, após 24 horas.

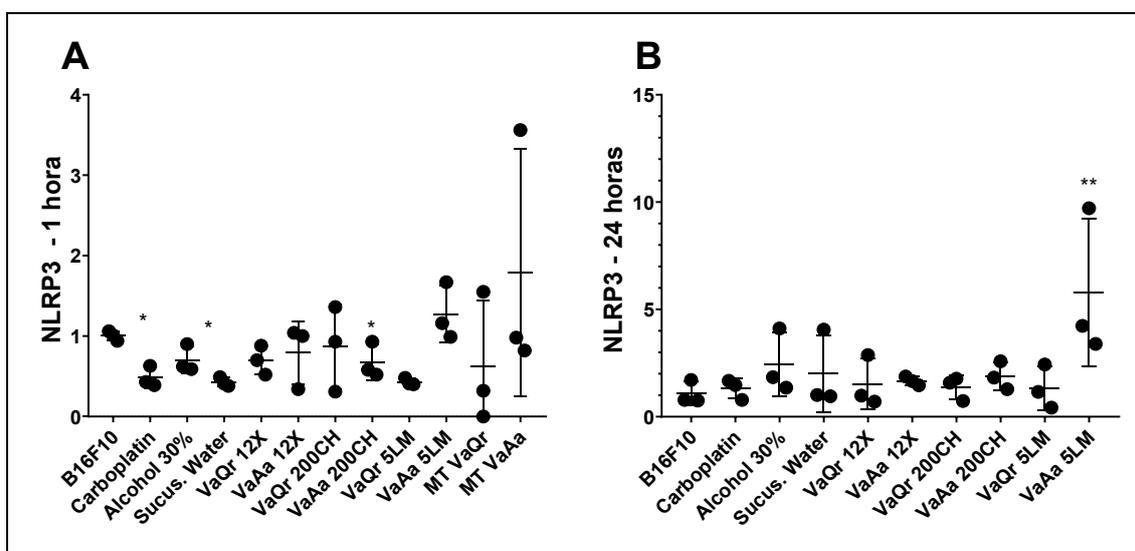


Representação gráfica da produção de citocinas inflamatórias (**A.** IL-1b **B.** IL-6 **C.** IL-12p40 **D.** IL-12p70 **E.** IL-18 **F.** IL-23 **G.** CXCL1 **H.** TNF- $\alpha$  ) nas células B16F10 após 24 horas dos tratamentos respectivos. N = 3.  $\alpha$  = 0,05. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

### Avaliação da Expressão de genes relacionados ao complexo inflamossoma.

Conforme observado na **figura 3A**, a expressão gênica de NLRP3 nas células de melanoma, após 1h dos tratamentos diminuiu significativamente nos controles Água Sucussionada ( $p < 0,05$ ) e Carboplatina ( $p < 0,05$ ), e no grupo tratado com VaQr 5LM ( $p < 0,05$ ). Contudo, pós 24 horas de tratamento (**Fig. 3B**), apenas a ultradiluição de VaAa 5LM ( $p < 0,01$ ) apresentou aumento da expressão gênica.

**Figura 3:** Expressão relativa de NLRP3 nas células B16F10 com ou sem cada um dos tratamentos, após 1 e 24 horas.

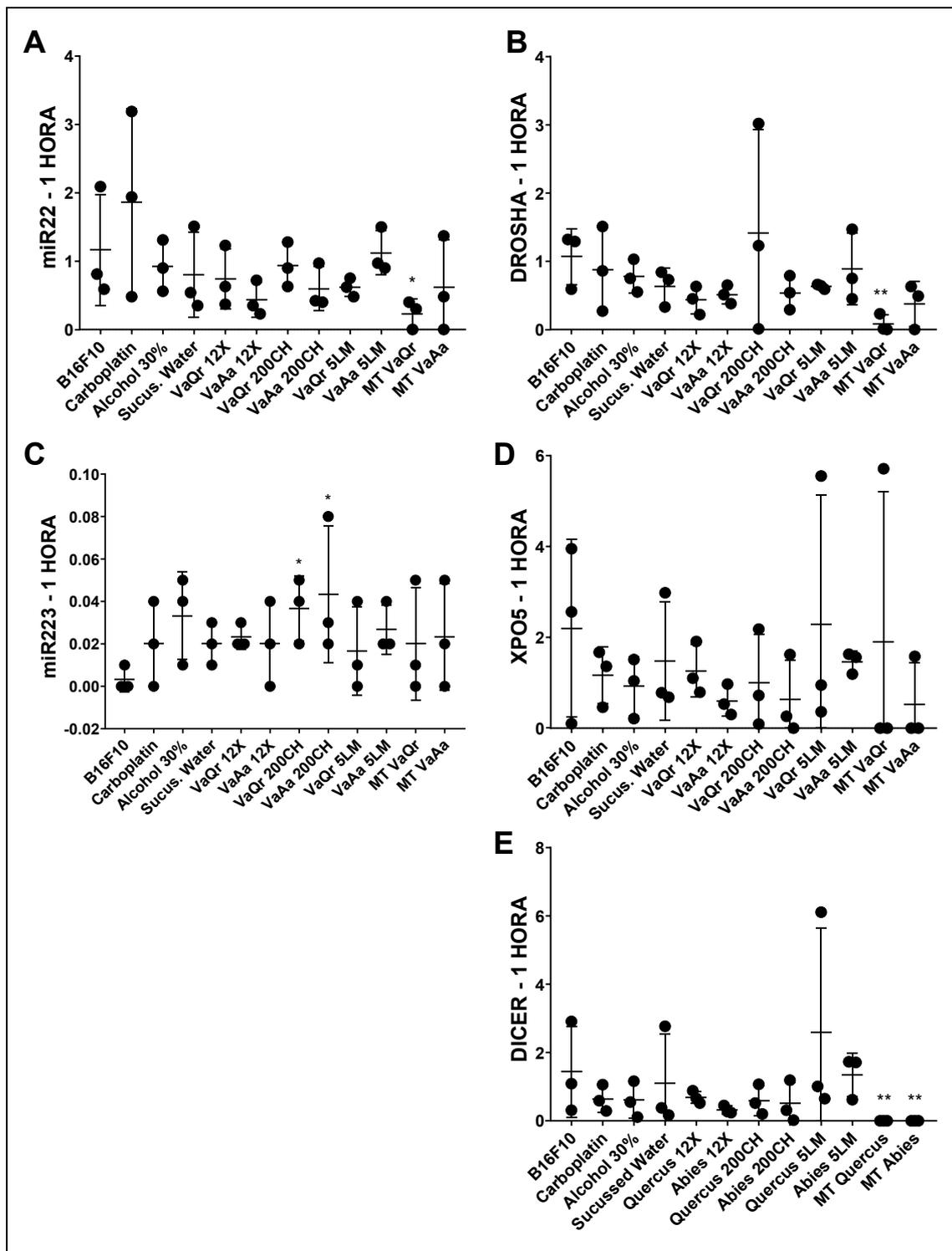


Representação gráfica da Expressão de NLRP3 nas células B16F10 após 1 (A) e 24 (B) horas dos tratamentos respectivos. . N = 3.  $\alpha = 0,05$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### Avaliação da Expressão de miRNAs relacionados ao complexo inflamossoma.

As diluições VaQr 200CH e VaAa 200CH apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) da expressão do miR-223 após 1 hora de tratamento. No mesmo período, a TM VaQr apresentou diminuição de miR-22 ( $p < 0,05$ ), Drosha ( $p < 0,01$ ) e Dicer ( $p < 0,01$ ), já a TM VaAa teve diminuição apenas de Dicer ( $p < 0,01$ ) (**fig. 4**).

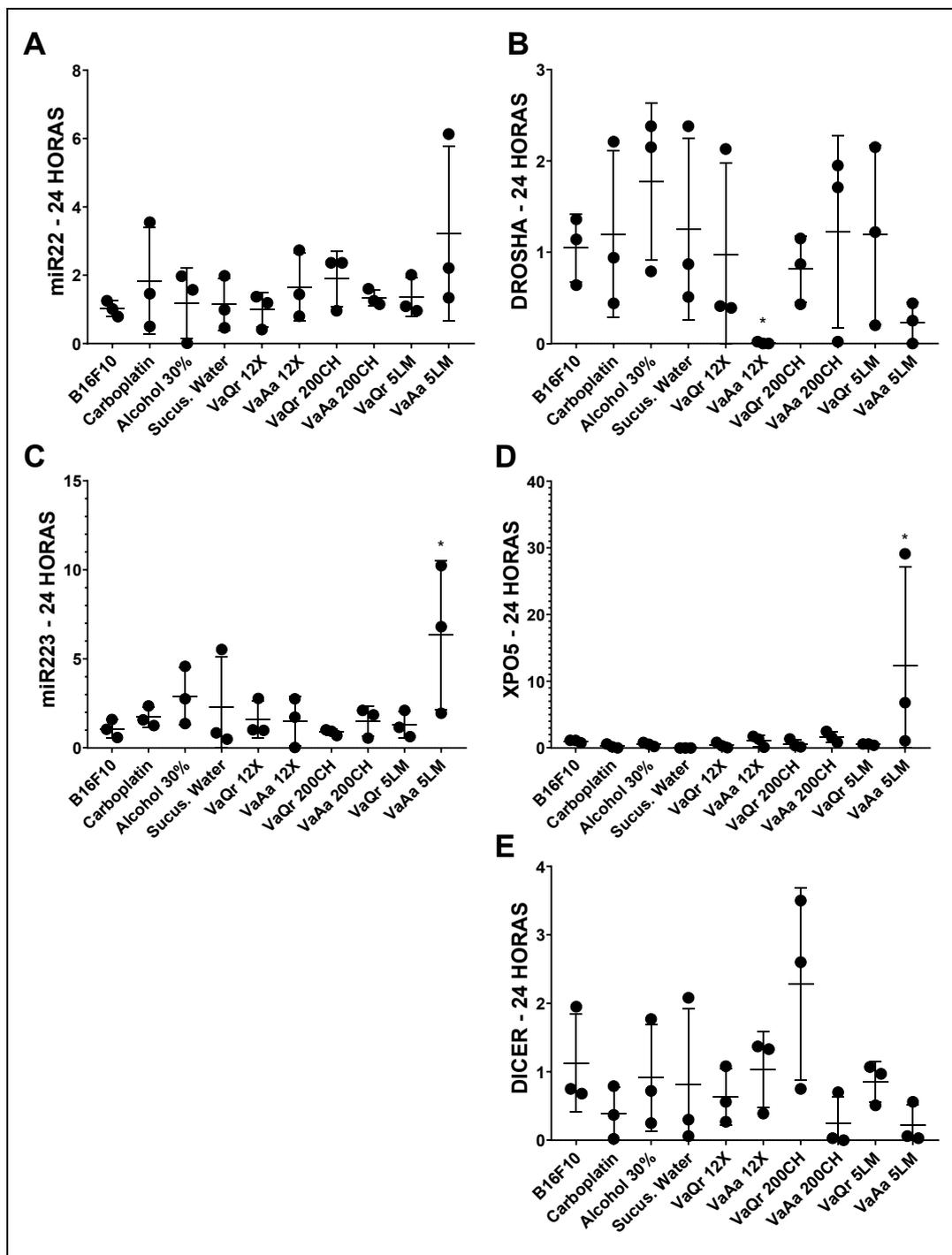
**Figura 4:** Expressão relativa de miRNAs nas células B16F10 com ou sem cada um dos tratamentos, após 1 hora.



Representação gráfica da Expressão de miRNAs (A. miR-22 B. Drosha C. miR-223 D. Xpo5 E. Dicer) nas células B16F10 após 1 hora dos tratamentos respectivos. . N = 3.  $\alpha = 0,05$ . \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Após 24 horas dos tratamentos, a ultradiluição VaAa 12X apresentou diminuição ( $p < 0,05$ ) na expressão de Drosha, enquanto VaAa 5LM demonstrou aumento de Xpo5 ( $p < 0,05$ ) e do miR-223 ( $p < 0,05$ ) (fig. 5).

**Figura 5:** Expressão relativa de miRNAs nas células B16F10 com ou sem cada um dos tratamentos, após 24 horas.



Representação gráfica da Expressão de miRNAs (A. miR-22 B. Drosha C. miR-223 D. Xpo5 E. Dicer) nas células B16F10 após 24 horas dos tratamentos respectivos. N = 3.  $\alpha = 0,05$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## DISCUSSÃO

A literatura tem reforçado, há tempos, o potencial dos medicamentos ultradiluídos na modulação de vias inflamatórias e epigenéticas (BELLAVITE *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2015; KANHERKAR *et al.*, 2017), alinhando-se aos efeitos observados neste estudo. Trabalhos demonstram que essas formulações são capazes de alterar perfis de citocinas, expressão gênica e níveis de estresse oxidativo em modelos tumorais (BONAMIN *et al.*, 2017; BALTUILLE, 2021).

Neste estudo, os resultados demonstram que a TM VaAa apresentou efeito pró-inflamatório após 1 hora de tratamento, com aumento de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40/p70, IL-18 e TNF- $\alpha$ , que pode estar relacionado com a diminuição que promoveu em Dicer. Essa resposta pode estar ligada à sua alta citotoxicidade, ao estresse oxidativo e à morte celular por necrose, conforme observado em estudos anteriores (HOLANDINO *et al.*, 2020; BALTUILLE, 2021).

Já a TM VaQr apresentou efeito não inflamatório, com aumento de IL-12p40 e IL-12p70 – citocinas que podem exercer funções antitumorais – além de apresentar diminuição de miR-22, Drosha e Dicer. O que corrobora com estudos anteriores, onde aumentou IL-12p70, diminui a expressão de MCP1 e teve menos estresse oxidativo (BALTUILLE, 2021).

Nas ultradiluições, VaAa 200CH e VaQr 200CH promoveram aumento de miR-223 após uma hora. Embora esse dado não tenha se mantido ao longo do tempo e estas ultradiluições não tenham apresentado modulações na expressão de citocinas, esse achado vale ser repetido em estudos futuros para compreender melhor a ação dessas diluições, uma vez que apresentaram diminuição de MCP-1 em estudos *in vitro*, e diminuição de IL-10 no soro de camundongos, em estudos *in vivo* (BALTUILLE, 2021; DA SILVA, 2023).

Semelhantemente, o tratamento com VaQr demonstrou diminuição de NLRP3 após 1 hora. No entanto, esse resultado não se manteve ao longo do tempo e não houve outras respostas que pudessem essas associadas. Contudo, essa potência apresentou diminuição de MCP1, *in vitro*; além de aumento da sobrevida, aumento de peso animal com diminuição do peso tumoral e diminuição de IL10 no soro, *in vitro* (BALTUILLE, 2021; DA SILVA, 2023). Demonstrando seu potencial efeito modulador que deve ainda ser melhor investigado.

Após 24 horas de tratamento VaAa 12X apresentou um efeito de modulação positiva da inflamação, com aumento de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que pode ter relação com a observada redução em Drosha. Embora, essa diluição tenha apresentado menor produção de EROs, *in vitro*. (BALTUILLE, 2021; DA SILVA, 2023).

Em contrapartida, VaAa 5LM apresentou resultados divergentes, com aumento de NLRP3, após 24 horas, possivelmente refletindo uma resposta compensatória ou ativação indireta do inflamossoma, já que ao mesmo tempo observou-se aumento de Xpo5 e miR-223, que deveriam estar modulando negativamente a expressão de NLRP3. Contudo, estudos *in vitro* mostraram que VaQr 5LM diminuiu MCP-1, o que foi considerado uma tendência de modulação negativa da resposta inflamatória (BALTUILLE, 2021).

No entanto, estudos recentes demonstram que o inflamossoma NLRP3 desempenha papéis duplos no câncer, podendo promover tanto progressão quanto supressão tumoral, dependendo do microambiente e do tipo celular (HAMARSHEH & ZEISER, 2020; KINRA *et al.*, 2023). Assim, os achados deste estudo reforçam a hipótese de que as preparações ultradiluídas podem influenciar vias críticas de sinalização celular.

Curiosamente, as respectivas diluições 12X e 5LM, de *Quercus robur*, apresentaram *in vivo*, resultados favoráveis; com ambas promovendo aumento da sobrevida e VaQr promoveu ainda, aumento do peso animal e com diminuição de peso tumoral e de IL-10 no soro (DA SILVA, 2023).

Vale observar que os controles, carboplatina e água sucussionada, apresentaram diminuição de NLRP3, possivelmente devido os efeitos antitumorais conhecidos da carboplatina que em muito tem se associado com o papel ambíguo da ação de NLRP3 no câncer (HAMARSHEH & ZEISER, 2020), bem como a presença de nano bolhas na água sucussionada, formadas durante o processo de dinamização, pode ter um efeito sobre essas células, conforme apontado por estudos de outros grupos (BELLAVITTE *et al.*, 2013; DEMANGEAT, 2015; GUEDES *et al.*, 2018; WASSENHOVEN *et al.*, 2024).

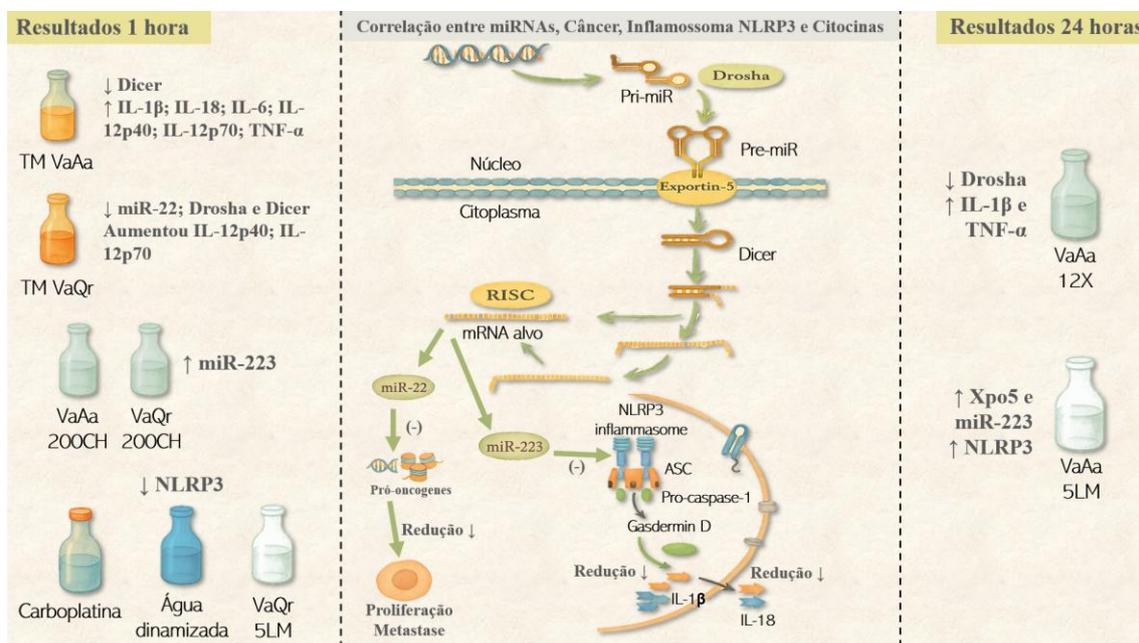
No cenário translacional, a oncologia veterinária emerge como um campo promissor para a aplicação de terapias integrativas, tanto pelo seu valor clínico quanto pela relevância dos estudos veterinários em pesquisa oncológica comparada (GILLARD *et al.*, 2014; TARONE *et al.*, 2019; VAN DER WEYDEN

et al., 2020). Estudos prévios do grupo demonstraram benefícios clínicos e comportamentais em camundongos tratados com VaQr 12X e 5LM, resultando em maior sobrevida e melhora do bem-estar (DA SILVA, 2023).

Quanto às limitações do presente estudo, o tamanho reduzido das amostras, devido limitações de financiamento, reforça a importância de estudos futuros que promovam a repetição dos achados e a compreensão aprofundada destes mecanismos. Com isso, a escolha metodológica de não aplicar correção para múltiplas comparações no pós-teste de Dunnett, foi intencional para permitir a visualização de tendências sutis, comuns em estudos com ultradiluições, embora aumente a chance de erro tipo I. No entanto, os achados aqui relatados são compatíveis com os efeitos já descritos na literatura especializada.

Em suma, este estudo reforça que preparações de *Viscum album*, tanto em forma de TMs quanto em ultradiluições, podem modular componentes-chave do inflamossoma e suas vias regulatórias. Isso abre espaço para novas investigações sobre seus mecanismos de ação e seu uso como adjuvantes na oncologia integrativa, tanto humana quanto veterinária.

**Ilustração 5:** Representação ilustrativa dos resultados obtidos com 1 e 24 horas dos tratamentos e sua correlação com os mecanismos de ativação e/ou supressão de tumores, bem como de miRNAs, inflamossoma NLRP3 e citocinas.



Fonte: Próprio autor.

## CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que preparações ultradiluídas de *Viscum album*, especialmente VaAa 12X e VaAa 5LM, foram capazes de modular componentes centrais da resposta inflamatória e da regulação epigenética em células de melanoma murino, após 24 horas. O aumento das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  após tratamento com VaAa 12X sugere ativação de vias pró-inflamatórias dependentes do inflamossoma NLRP3, o que condiz com a diminuição que promove em Drosha. Já o aumento tardio (24 horas) da expressão gênica de NLRP3 com VaAa 5LM aponta para uma possível resposta compensatória, uma vez que apresenta aumento da expressão de Xpo5 e miR-223.

As TMs evidenciaram ação pró-inflamatória significativa, corroborando com dados prévios sobre sua citotoxicidade e reforçando o contraste entre os efeitos agudos das TMs e a ação mais sutil e regulatória das ultradiluições. Adicionalmente, a modulação da expressão de miRNAs, especialmente o aumento de miR-223 pelas diluições centesimais e cinquenta-millesimais, indica possível envolvimento epigenético dessas formulações na regulação do inflamossoma.

Os resultados reforçam a hipótese de que medicamentos ultradiluídos podem interferir em vias moleculares críticas da inflamação, a depender da dose e do tempo de tratamento, e apresentam potencial terapêutico adjuvante na oncologia integrativa. A singularidade das respostas observadas, tanto em nível de citocinas quanto na expressão de genes e miRNAs, aponta para uma ação específica e biologicamente ativa dessas formulações, apesar de sua alta diluição.

Embora o número reduzido de amostras represente uma limitação metodológica, os dados obtidos são coerentes com a literatura e abrem caminho para investigações futuras mais amplas e aprofundadas. Os achados apresentados são inovadores e contribuem para o entendimento dos mecanismos de ação de preparações ultradiluídas, e para a construção de novas estratégias terapêuticas que integrem imunomodulação, epigenética e práticas

de medicina complementar, com foco na sobrevida com qualidade de vida dos pacientes humanos e animais.

### **CONFLITOS DE INTERESSE**

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

### **FINANCIAMENTO**

O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 8ª edição. **Elsevier Editora**, 2015.

AHMED, B.; QADIR, M. I.; GHAFOR, S. Malignant Melanoma: Skin Cancer- Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, 2020.

ANGERER, H. *et al.* Homeopathic Cancer Therapy Research from 2018 to 2022: A Review of the Literature. **ResearchGate**, 2023.

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.

BAILLIF, S.; NAHON-ESTEVE, S.; PACE-LOSCOS, T.; PAGÈS, G.; DUFIES, M. Aqueous humor mediator levels as biomarkers of anti-VEGF response in age-related macular degeneration. **Cytokine**. 2025.

BALTUILLE, P. I. Avaliação *in vitro* do efeito de preparações homeopáticas de *Viscum album* sobre células de melanoma murino. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) – Faculdade de Medicina Veterinária, **Universidade Paulista**, São Paulo, 2021.

BAUERNFEIND, F. G. *et al.* Cutting edge: NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **The Journal of Immunology**, 2009.

BELLAVITE, P. *et al.* High-dilution effects revisited. Pharmacodynamic mechanisms. **Homeopathy**. 2014.

BONAMIN, L. V.; DE CARVALHO, A. C.; WAISSE, S. *Viscum album* (L.) in experimental animal tumors: A meta-analysis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 13, n. 6, p. 2723-2740, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)**. Estimativa 2019: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

CARRILHO, M. C. Tumores orais sólidos em cães: aspectos epidemiológicos e etiológicos. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – **Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2024.

CEREGHETTI, A. S. P. *et al.* DNA Methyltransferase Inhibition Upregulates the Costimulatory Molecule ICAM-1 and the Immunogenic Phenotype of Melanoma Cells. **JID Innov**, 2024.

CHEN, J. *et al.* Circulating cytokine associations with clinical outcomes in melanoma patients treated with combination nivolumab plus ipilimumab. **Oncoimmunology**. 2025.

CHENG, R. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. **International Journal of Oral Science**, 2020.

CHIVITE-LACABA, M. *et al.* Delineation of monocytic and early-stage myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of patients with hepatocarcinoma. **Int J Cancer**. 2025.

ĆWIKLIŃSKA-DWORAKOWSKA, M. *et al.* Preliminary results suggest the potential of evaluating combined bFGF and TNF- $\beta$  concentrations for differentiating papillary thyroid cancer from benign nodular goiter. **Sci Rep**. 2025.

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

DANG, C. *et al.* Causal relationship between inflammatory factors and gynecological cancer: a Bayesian Mendelian randomization study. **Sci Rep**. 2024.

DAVANZO, G. G. Inflamossoma NLRP3 como um possível mecanismo na mediação de déficits funcionais na hipertensão: efeitos do treinamento aeróbio. Dissertação (Mestrado) – **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2017.

DAVIS, L. E.; SHALIN, S. C.; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy**, 2019.

DEHNE, E. M.; HASENBERG, T.; MARX, U. The ascendance of microphysiological systems to solve the drug testing dilemma. **Future Science**, 2017.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R. *et al.* Interleukin-12 treatment reduces tumor growth and modulates the expression of CASKA and MIR-203 in athymic mice bearing tumors induced by the HGC-27 gastric cancer cell line. **Pathol Res Pract**. 2024.

DEMANGEAT J L. Gas nanobubbles and aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization, **Homeopathy**. 2015.

DENG, J. *et al.* N7-methylguanosine methylation-related regulator genes as biological markers in predicting prognosis for melanoma. **Sci Rep**, 2022.

DIOS-FIGUEROA, G. T. *et al.* 3D cell culture models in covid-19 times: a review of 3D technologies to understand and accelerate therapeutic drug discovery. **Biomedicines**, 2021.

EICHWALD, T. *et al.* Anti-Inflammatory Effect of Caffeine on Muscle under Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **Antioxidants**, 2023.

FELENDÁ, J. E.; TUREK, C.; STINTZING, F. C. Antiproliferative potential from aqueous *Viscum album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and puothonin on human cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 236, p. 100-107, 2019.

FILIPÍAK-DULIBAN, A. *et al.* Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models. **Int. J. Mol. Sci**, 2022.

GHALWASH, D.; AMMAR, A.; ABOU-BAKR, A.; DIAB, A.H.; EL-GAWISH, A. Validation of salivary proteomic biomarkers for early detection of oral cancer in the Egyptian population. **Future Sci OA**. 2025.

GILLARD, M. *et al.* Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment Cell Melanoma Res**, 2014.

GUEDES, J. R. P.; BONAMIN, L. V.; CAPELOZZI, V. L. Water-Related Mechanisms Proposed for Storing and Transmitting Homeopathic Information: Putative Links with Biological Responses. **Homeopathy**. 2018.

HAMARSHEH, S.; ZEISER, R.. NLRP3 Inflammasome Activation in Cancer: A Double-Edged Sword. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

HOLANDINO, C. *et al.* Phytochemical analysis and in vitro antiproliferative activity of *Viscum album* ethanolic extracts. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, 2020.

HOLANDINO, C. *et al.* *Viscum album* homeopathic tinctures: phytochemical profile and antiproliferative activity. **International Journal of High Dilution Research**, 2018.

HOUSHMANDFAR, N. *et al.* Emerging roles of miR-223 and miR-22 in inflammation and cancer: From molecular targets to therapeutic potential. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

HÜLSENBUSCH, J. *et al.* Therapeutic approaches to modulate the inflammasome in cancer: A translational perspective. **Cancers**, 2023.

JORGE, A. L. *et al.* MicroRNAs: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. **Einstein**, 2021.

KANHERKAR, R. R. *et al.* Epigenetic Mechanisms of Integrative Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017

KELLER, P.; VANWESENBEECK, I.; DECLOEDT, A. Surveying dog owners' use and understanding of, and communication with veterinarians about, complementary and alternative veterinary medicine. **VetRecord**, 2022.

KHUDA-BUKHSH, A. R.; SIKDAR, S. Condurango 30C Induces Epigenetic Modification of Lung Cancer-specific Tumour Suppressor Genes via Demethylation. **Forsch Komplementmed**, 2015.

KINRA, M. *et al.*. The interplay between NLRP3 inflammasome and cancer: Potential therapeutic implications. **Current Opinion in Pharmacology**, 2023.

KINRA, M. *et al.*. Involvement of NLRP3 inflammasome pathway in the protective mechanisms of ferulic acid and p-coumaric acid in LPS-induced sickness behavior and neuroinflammation in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2024.

KLICKS, J. *et al.*. A novel spheroid-based co-culture model mimics loss of keratinocyte differentiation, melanoma cell invasion, and drug-induced selection of ABCB5-expressing cells. **BMC Cancer**, 2019.

KODI, T. *et al.*. Neuroprotective Effects of Metformin and Berberine in Lipopolysaccharide-Induced Sickness-Like Behaviour in Mice. **Adv Pharmacol Pharm Sci**, 2024.

KONSMAN, J. P. So Many Faces, Phases, and Facets, Sickness Behavior Beyond Disciplines. **Frontiers in Psychiatry**, 2021.

KOPEC, A. K. *et al.*, Microphysiological systems in early stage drug development: Perspectives on current applications and future impact. **The Journal of Toxicological Sciences**. v. 46 (3), p. 99-114, 2021.

LA'AH, A.S, *et al.* Neutrophils Recruited by NKX2-1 Suppression via Activation of CXCLs/CXCR2 Axis Promote Lung Adenocarcinoma Progression. **Adv Sci (Weinh)**. 2024.

LIMA, A. L. *et al.* Melanomas em cães no Sertão do Nordeste do Brasil-epidemiologia, fatores de risco e achados clinicopatológicos. **Acta sci. vet.(Impr.)**, p. Pub. 1878-Pub. 1878, 2022.

LIU, A., *et al.* CXCL1 and CXCL8: Reliable and feasible biomarkers differentiating intrapulmonary metastasis from multiple primary neoplasms in non-small cell lung cancers. **Cancer Biomarkers**. 2025.

MADDEN, G.R.; PREISSNER, R.; PREISSNER, S.; PETRI, W.A. Anti-interleukin-23 treatment linked to improved *Clostridioides difficile* infection survival. **Gut Microbes**. 2025.

MANÁVOLA, F. *et al.* Extracellular Vesicles and Epigenetic Modifications Are Hallmarks of Melanoma Progression. **Int. J. Mol. Sci**, 2020.

MARCONI, A. *et al* Progress in melanoma modelling in vitro. **Experimental Dermatology**, 2018.

MATT, S. M. Inhibition of DNA Methylation With Zebularine Alters Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behavior and Neuroinflammation in Mice. **Front Neurosci**, 2018.

OMDAL, R. The biological basis of chronic fatigue: neuroinflammation and innate immunity. **Curr Opin Neurol**, 2020.

PEREIRA, T. G. G. *et al.* Epidemiologia dos tumores de pele melanoma e não melanoma: uma comparação de dados de incidência, mortalidade e opções terapêuticas. **Revista Delos**, [S. l.], v. 18, n. 63, p. e3620, 2025.

REBECA, V. W.; SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma. **Nat Commun**, 2020.

RICARTE, F.; MARQUES, J. C.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102-1107, 2006.

SAFI, M. *et al.* Inflammasome signaling in cancer: A double-edged sword. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 25, n. 15, p. 8191, 2024.

SAFI, S. *et al.* Low tumor interleukin-1 $\beta$  expression predicts a limited effect of adjuvant platinum-based chemotherapy for patients with completely resected lung adenocarcinoma: An identification and validation study. **Pulmonology**. 2025.

SAHA, S. K.; ROY, S.; KHUDA-BUKHSH, A. R., Ultra-highly diluted plant extracts of *Hydrastis canadensis* and *Marsdenia condurango* induce epigenetic modifications and alter gene expression profiles in HeLa cells in vitro. **Journal of Integrative Medicine**, 2015.

SAINI, S.; GADET, J.A.M.A.; FREEMAN, G.J.; CHIOCCA, E.A.; MINEO, M. Improving IL12 immunotherapy in glioblastoma by targeting the long noncoding RNA INCR1. **J Neurooncol**. 2025.

SCHAD, F. *et al.* Patients with Advanced or Metastasised Non-Small-Cell Lung Cancer with *Viscum album* L. Therapy in Addition to PD-1/PD-L1 Blockade: A Real-World Data Study. **Cancers (Basel)**, 2024.

SCHMITT, O. *et al.* Regular Positive Human Contacts Do Not Improve Pigs' Response to a Lipopolysaccharide Immune Challenge. **Neuroimmunomodulation**, 2025.

SHARMA, B.; SHARMA, P. K. Homeopathy and Cancer: A Review. **Journal of Applied Dental and Medical Sciences**, v. 5, p. 1, 2019.

SHEN, J.; WANG, M.; LI, F.; YAN, H.; ZHOU, J. Homeodomain-containing gene 10 contributed to breast cancer malignant behaviors by activating Interleukin-6/Janus kinase 2/Signal transducer and activator of transcription 3 pathway. **Bioengineered**. 2022.

SOMOVA, M. *et al.* Integrating tumor and healthy epithelium in a micro-physiology multi-compartment approach to study renal cell carcinoma pathophysiology. **Sci Rep**. 2024.

SONG, Qian; AN, Quanlin; NIU, Bing; LU, Xiaoling; ZHANG, Ning; CAO, Xin. Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism. **Journal of Oncology**, v. 2019.

STRUB, T.; BALLOTTI, R.; BERTOLOTTO, C. The “ART” of Epigenetics in Melanoma: From histone “Alterations, to Resistance and Therapies” **Theranostics**, 2020.

TARONE, L. *et al.* Naturally occurring cancers in pet dogs as pre-clinical models for cancer immunotherapy. **Cancer Immunol Immunother**, 2019.

VALENCIA, B.M. *et al.* The severity of the pathogen-induced acute sickness response is affected by polymorphisms in genes of the NLRP3 inflammasome pathway. **Brain Behav Immun**. 2021.

VALENCIA, D. A. *et al.* The NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases: A target with therapeutic potential. **Cancers**, Basel, v. 13, n. 10, p. 2297, 2021.

VALENTI, M. *et al.* Safety of interleukin inhibitors in patients with plaque psoriasis and history of neoplasms: a multicenter retrospective study - IL PSO (Italian landscape psoriasis). **J Dermatolog Treat**. 2025.

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

VENTURA, L. *et al.* Involvement of NLRP3 inflammasome in schizophrenia-like behaviour in young animals after maternal immune activation. **Acta Neuropsychiatr**. 2020.

WANG, X. *et al.* miR-223-3p inhibits melanoma cell proliferation and migration through targeting NLRP3. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2021.

WASSENHOVEN, M. V. *et al.* Characterisation of Aqueous Ultra-high Homeopathic Potencies: Nanoparticle Tracking Analysis. **Homeopathy**. 2024.

WINKLER, C. *et al.* Homeopathy in supportive cancer care: An update of evidence and recommendations. **Complementary Therapies in Medicine**, 2023.