

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

EFEITOS DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO
***CARCINOSINUM* EM ADENOCARCINOMA**
MAMÁRIO (4T1) *IN VITRO*

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.

THAÍS CRISTINA DA SILVA

SÃO PAULO

2019

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

EFEITOS DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO
***CARCINOSINUM* EM ADENOCARCINOMA**
MAMÁRIO (4T1) *IN VITRO*

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, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin.

THAÍS CRISTINA DA SILVA

SÃO PAULO

2019

Silva, Thaís Cristina da.

Efeitos do medicamento homeopático *Carcinosinum* em adenocarcinoma mamário (4T1) *in vitro* / Thaís Cristina da Silva. - 2019.

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin.

1. *Carcinosinum*. 2. Células 4T1. 3. Homeopatia. 4. Câncer de mama. I. Bonamin, Leoni Villano (orientadora). II. Título.

THAÍS CRISTINA DA SILVA

**EFEITOS DO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO
CARCINOSINUM EM ADENOCARCINOMA
MAMÁRIO (4T1) *IN VITRO***

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.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin
UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

Prof.^a Dr.^a Juliana Gimenez Amaral
UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

Prof.^a Dr.^a Cideli de Paula Coelho
UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO - UNISA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à minha mãe, por ter me proporcionado a vida! Sempre dedicada, foi capaz de cuidar de uma família toda sozinha, fazendo o papel de mãe e de pai. Meu orgulho e amor por você são infinitos.

A meu noivo, Jorge, que já recebeu minha dedicatória na graduação, na especialização e agora no mestrado, pois caminhamos lado a lado há quase dez anos. Obrigada pela paciência, amor, compreensão, apoio e por me fazer feliz, dividindo experiências maravilhosas. Cada palavra sua me dá forças para continuar. Obrigada por entender minha ausência em alguns momentos. Saiba que faço por nós e por tudo o que sonhamos.

Ao meu “paidrasto”, por todo carinho nestes quinze anos de convívio. Obrigada por ter sempre me apoiado e acreditado que sou capaz de tudo.

A minha irmã, que mesmo nove anos mais velha, por vezes, parece mais nova. Saiba que, todas as vezes que brigo com você, é sempre no intuito de fazê-la enxergar quanto a vida tem a oferecer e o quão longe você pode chegar. Desejo a você tudo o que sonho para mim.

A minha avó, Alice (*in memoriam*), minha referência e companheira por muitos anos, enquanto minha mãe trabalhava fora. Às vezes, sinto que faltaram palavras para expressar meu amor e gratidão a você, mas sei que, de onde estiver, pode me ver e sentir tudo o que faltou ser dito. Obrigada por tanto!

A meu sogro e a minha sogra, que sempre me trataram como uma filha, incentivando-me em todos os momentos, demonstrando interesse por tudo o que faço. Gratidão.

AGRADECIMENTOS

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

Em especial, agradeço à minha querida orientadora, Prof.^a Dr.^a Leoni Villano Bonamin, por me acolher, entender todas as dificuldades que enfrentei e, ainda assim, não desistir de mim. Obrigada por sua confiança e carinho, por sua paciência, por ser aquela voz que acalma, transmite paz e faz crer que tudo dará certo ao seu lado. Por sua força em fazer acontecer apesar dos obstáculos, por compartilhar seu vasto conhecimento, minha eterna gratidão, respeito e admiração. Sem você, esse sonho não seria possível.

À Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Perez Hurtado, sempre presente, ajudando em cada experimento, apoiando, ensinando, corrigindo e, acima de tudo, cuidando de todos os alunos do programa. Por sua generosidade e carinho, obrigada!

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

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, em especial, ao Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha, figura essencial nos experimentos, sempre disposto a ajudar, ensinar e corrigir. Gratidão!

Aos amigos que a vida me trouxe por intermédio da UNIP, William Alves dos Santos e Sandra A. G. Pinto. Sann, obrigada por compartilhar, com amor, tudo o que aprendeu. Sem você, esse trabalho não seria possível. Will, obrigada por ser parceiro, minha dupla; pelos dias que passamos juntos e aprendemos juntos, por cada risada, susto e abraço. Levo vocês para a vida.

À minha coordenadora, Prof.^a Dr.^a Tais Fortes, que sempre me incentivou a crescer e abriu as portas, para que essa trajetória iniciasse. Nesses anos ao seu lado, sempre senti orgulho, respeito e admiração pela profissional e pessoa que

você é. Obrigada por sempre me entender, apoiar e desdobrar-se para me ajudar. Prometo não decepcionar. Minha eterna gratidão.

Aos verdadeiros amigos, em especial, à Thalita Serrano, Edilene Vazi e Karina Nascimento, que ficaram a meu lado nos momentos difíceis e ajudaram-me de tantas formas, que talvez nem saibam. Os abraços, o carinho, as palavras foram essenciais para o meu seguir.

Agradeço ainda as professoras e colegas Eloise Vieira, Rachel Franklin, Fabiane Marui e Elizete Sampaio, sempre dispostas a ajudar, sempre presentes nos momentos em que mais necessitei. Obrigada, de coração.

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

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

Samuel Hahnemann

RESUMO

O medicamento *Carcinosinum* é um nosódio (medicamento homeopático preparado a partir de tecidos cancerosos) indicado como tratamento complementar em pacientes oncológicos. Na literatura científica, há poucas publicações disponíveis sobre seu mecanismo de ação. O presente estudo teve como objetivo identificar possíveis alterações fenotípicas de células 4T1 (adenocarcinoma mamário murino) *in vitro*, incluindo viabilidade, expressão de HER-2 e potencial metastático, após tratamento com *Carcinosinum* em diferentes diluições homeopáticas (12cH; 30cH; 200cH), agitadas mecanicamente em água pura estéril a partir de uma matriz comercial. Todas as células tratadas foram cultivadas em meio R10, sendo a densidade celular de 1×10^5 células por garrafa pequena. Após 24 horas de tratamento, foi analisada a porcentagem de células em apoptose pela expressão de anexina V, sendo a contagem de células positivas feita de forma automatizada. A morfologia das células 4T1 foi avaliada a partir das colorações hematoxilina-eosina e Giemsa, enquanto a expressão de HER-2 foi avaliada por imunocitoquímica. O potencial metastático foi avaliado pela expressão e atividade de metaloproteinase 9 (MMP-9), por zimografia. O perfil de citocinas produzidas pelas células 4T1 foi estabelecido por *Cytometric Bead Array* (CBA). Os resultados obtidos sugerem que o tratamento de células 4T1 *in vitro* com *Carcinosinum* produz diversas alterações fenotípicas relacionadas ao desenvolvimento tumoral, na dependência da diluição utilizada, tais como: aumento do número de células positivas para anexina V (células em apoptose), hiper-expressão de HER-2 na membrana plasmática e diminuição da expressão de pró-MMP-9. Não foram observadas diferenças na produção de citocinas entre os tratamentos. Os dados apontam para diferentes efeitos do *Carcinosinum* no perfil fenotípico de células 4T1 *in vitro*. Contudo, estudos adicionais são necessários para a compreensão da importância desses achados na evolução clínica das neoplasias malignas.

Palavras-chave: *Carcinosinum*, células 4T1, homeopatia, câncer de mama.

ABSTRACT

Carcinosinum is a nosode, a homeopathic medicine prepared from cancerous tissues, and is indicated as complementary treatment in cancer patients. There are few publications available in the scientific literature about its mechanism of action. The present study aimed to identify possible phenotypic changes of 4T1 cells (murine mammary adenocarcinoma) *in vitro*, including viability, HER-2 expression and metastatic potential, after treatment with *Carcinosinum* in different homeopathic dilutions (12cH, 30cH, 200cH), shaken mechanically in sterile pure water from a commercial matrix. All treated cells were cultured in R10 medium, the cell density being 1×10^5 cells per small flask. After 24 hours of treatment, the percentage of cells in apoptosis was analyzed by the expression of annexin V, being the counting of positive cells done in an automated way. The morphology of 4T1 cells was evaluated by hematoxylin-eosin and Giemsa staining, while HER-2 expression was assessed by immunocytochemistry. The metastatic potential was evaluated by expression and activity of metalloproteinase 9 (MMP-9), by zymography. The cytokine profile produced by the 4T1 cells was established by Cytometric Bead Array (CBA). The results suggest that the treatment of 4T1 cells *in vitro* with *Carcinosinum* produces several phenotypic changes related to tumor development, depending on the dilution used, such as: increase in the number of annexin V-positive cells (apoptosis), hyperexpression of HER-2 on the plasma membrane and decreased expression of pro-MMP-9. There were no differences in cytokine production between treatments. The data point to different effects of *Carcinosinum* on the phenotypic profile of 4T1 cells *in vitro*, however, additional studies are needed to understand the importance of these findings in the clinical evolution of malignant neoplasms.

Key words: *Carcinosinum*, 4T1 cells, homeopathy, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fluxograma representativo da metodologia utilizada no trabalho. Cada item representa uma fonte de células com o mesmo número de passagens (garrafa de cultura). Diferentes tratamentos foram aplicados para obtenção das amostras.....**34**
- Figura 2:** Incidência de apoptose em células 4T1 mantidas em monocultura por 24 horas, em função dos diferentes tratamentos.....**35**
- Figura 3:** Fotomicrografias de células 4T1 em esfregaços obtidos da ressuspensão celular, fixados com metanol absoluto por 15 minutos e corados pelos métodos hematoxilina-eosina, Giemsa e imunocitoquímica para HER2.....**37**
- Figura 4:** Bandas de digestão do gel, obtidas em ensaio de zimografia.....**38**
- Figura 5:** Representação do perfil de citocinas (pg/mL) relacionadas aos padrões Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ) pela técnica Cytometric Bead Array – CBA.....**40**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Descrição das matrizes: lote, data de fabricação e validade.....	27
Quadro 2: Descrição da composição dos diferentes tratamentos nas placas de cultivo.....	29
Quadro 3: Demonstração de todos os resultados obtidos.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. – Antes de Cristo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBA – *Cytometric beads array*

cH – Diluição centesimal Hahnemaniana

CO₂ - Dióxido de carbono

D18 – Dia 18

D29 – Dia 29

DMSO - Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

D.O – Densidade óptica

F.I – Fator de intensidade de digestão

HE- Hematoxilina-eosina

HER-2 - Human epidermal growth factor receptor-type 2

IFN-γ – Interferon gama

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MB – Membrana basal delimitadora

MEC – Matriz extracelular

MMP / MMPs – Metaloproteinases

µg – Micrograma

mL - Mililitro

µL – Microlitro

mM - Milimolar

nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Phosphate buffered saline (Tampão Fosfato Salino)

PE – Fluorocromo ficoeritrina

R10 – Meio de cultura RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino

rpm – Rotação por minuto

RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium

SDS- Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

TIL / TILs – Leucócitos infiltrantes de tumores

TIMPs- Inibidores teciduais

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O Câncer.....	15
1.2 Estimativa mundial e brasileira.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Câncer de mama.....	17
2.1.1 Tumor mamário 4T1.....	20
2.2 Terapias complementares e alternativas	20
2.3 A homeopatia.....	21
2.4 <i>Carcinosinum</i>	24
3. JUSTIFICATIVA.....	26
4. OBJETIVO.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 Preparo dos medicamentos	27
5.2 Codificação dos frascos	28
5.3 Cultura de células 4T1	28
5.4 Análise da incidência de apoptose.....	29
5.5 Morfologia celular por meio de Hematoxilina – Eosina e Giemsa	30
5.6 Expressão de HER-2 por meio de Imunocitoquímica.....	30
5.7 Atividade enzimática das metaloproteinases por meio da técnica de Zimografia	30
5.8 Determinação do perfil de citocinas pela técnica CBA.....	32
5.9 Ética	32
5.10 Delineamento experimental	33
5.11 Análise Estatística	33
6. RESULTADOS	35
6.1 Apoptose	35

6.2	Morfologia celular e expressão de HER-2.....	35
6.3	Metaloproteinases.....	38
6.4	Avaliação da produção de citocinas das células 4T1 pelo método CBA.....	39
7.	DISCUSSÃO.....	42
8.	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer

Considerado a segunda maior causa de morte entre crianças e adultos no mundo, o câncer é um importante problema de saúde pública, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Resulta de uma desordem genética causada por mutações do DNA, que podem ocorrer por fatores intrínsecos ou extrínsecos, associados a alterações epigenéticas que modificam a expressão ou função dos genes-chave que regulam os processos celulares fundamentais de crescimento, diferenciação, sobrevivência e senescência (KUMAR *et al.*, 2005; HANAHAN; WEINBERG, 2011). A proliferação anormal e descontrolada das células forma tumores que, posteriormente, podem alcançar outros órgãos ou tecidos distantes, formando tumores secundários ou metástases, um dos principais sinais dos cânceres altamente agressivos (GOMES; MOREIRA, 2007).

No entanto, uma única mutação dificilmente leva à formação de um tumor. Para que esse processo ocorra, são necessárias várias modificações genéticas que vão, progressivamente, interferindo nos mecanismos responsáveis pelo controle da proliferação, diferenciação e morte celular (LODISH *et al.*, 2004).

De acordo com HANAHAN e WEINBERG (2011), existem alguns aspectos críticos que justificam a letalidade dessa doença: aumento de sinalizações proliferativas; evasão dos fatores supressores de crescimento; capacidade de ativação de mecanismos de invasão tecidual e metástase; escape à destruição pelo sistema imunológico; ausência de limites para o potencial de replicação; promoção da inflamação tumoral; capacidade angiogênica; resistência à apoptose; capacidade de desregular a energia celular; capacidade de provocar inflamação; promoção de instabilidade do genoma e mutações. Tais aspectos são chamados “Hallmarks of Cancer”.

O primeiro relato registrado sobre o câncer data de 4000 a.C., associado a um fóssil maxilar com lesões características de linfoma (RENAN, 2002). No Brasil, um dos primeiros relatos data de 1904, quando o periódico “Brasil-Médico” publicou o trabalho “Frequência do câncer no Brasil”. Essa publicação, que focava o período entre 1894 e 1898, mostrou predominância do câncer uterino, tornando-se conhecida como a primeira manifestação sobre o assunto no âmbito científico e acadêmico brasileiro. De acordo com o Ministério da Educação e Saúde, nos dados referentes ao período de 1929 a 1932, nas capitais dos Estados, as primeiras publicações oficiais de mortalidade por câncer datam de 1944. Esses dados encontram-se no Anuário de Bioestatística (BRASIL, 2005).

No Estado de São Paulo, segundo a “Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (SEADE)”, a presença de mortalidade por câncer é apontada desde 1898, conforme o “Anuário Estatístico do Estado de São Paulo”, antes denominado “Relatório e Resumo Anual”. Outros Estados da Federação também têm publicações semelhantes a respeito dessa mortalidade (BRASIL, 2005).

1.2 Estimativa mundial e brasileira

Informações sobre a ocorrência de câncer e seu desfecho são requisitos essenciais para os programas nacionais e internacionais de controle, bem como para o planejamento de novos estudos científicos. A estimativa mundial realizada, em 2012, pelo projeto Globocan/IARC revela a ocorrência de 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos, com predomínio do sexo masculino em incidência (53%) e em mortalidade (57%) (FERLAY *et al.*, 2014).

De modo geral, as maiores taxas de incidência foram observadas nos países desenvolvidos (América do Norte, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia), onde predominaram os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto). Nos países de baixo e médio desenvolvimento, ainda há alta ocorrência de tipos de câncer

associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado) (FERLAY *et al.*, 2014).

Com base no documento *World Cancer Report 2014*, da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que, nas próximas décadas, o câncer corresponderá a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos esperados para 2025 (BRASIL, 2015). No biênio 2018-2019, a estimativa para o Brasil aponta para cerca de 600 mil novos casos de câncer a cada ano, sendo 68 mil de próstata em homens e 60 mil de mama em mulheres, índice que os torna os mais frequentes (BRASIL, 2018).

De acordo com o INCA (BRASIL, 2018), com exceção do câncer de pele não melanoma, que corresponderá a cerca de 170 mil novos casos, os tipos de câncer mais incidentes em homens serão: próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os mais incidentes serão os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireóide (4,0%).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de mama

Entre os diferentes tipos de neoplasias, o câncer de mama é o mais comum entre a população feminina mundial – com exceção aos casos de câncer de pele não melanoma – sendo descrito como uma neoplasia maligna com incidência crescente (PARKIN, 2001). No entanto, é um tipo de câncer que possui possibilidade significativa de sobrevida quando detectado precocemente (CAVALCANTE *et al.*, 2013). Vale ressaltar que, apesar de ser mais comum em mulheres, homens também possuem glândulas mamárias e hormônios femininos em pequenas quantidades e, portanto, podem desenvolver a doença. Dados revelam que, para cada 100 mulheres diagnosticadas com câncer de mama, há um homem com o mesmo diagnóstico, o que corresponde a 1% do total de casos da doença (BRASIL, 2018).

O câncer de mama resulta de alterações moleculares geneticamente herdadas e/ou externamente induzidas. Uma das alterações moleculares significativas observadas é a amplificação do gene e consequente superexpressão da proteína HER-2, um receptor de membrana com atividade tirosina-quinase (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A sigla HER-2 é a abreviatura de "Human Epidermal Growth Factor Receptor-Type 2", ou seja, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico. Em quantidades normais, essa proteína desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento de uma vasta categoria de células. Entretanto, essa superexpressão encontra-se associada a um prognóstico ruim (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

De modo geral, a superexpressão do HER-2 ocorre de 20 a 30% dos carcinomas mamários invasivos. Pacientes com superexpressão desse receptor ou aumento do número de cópias do gene correspondente apresentam comportamento tumoral mais agressivo, piora no prognóstico, menor sobrevida global, maior risco de recidiva e metástases e, ainda, resposta variável aos diferentes agentes quimioterápicos e hormonais (HADDAD, 2010). A superexpressão do HER-2 encontra-se associada à resistência à ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil (CMF) e tamoxifeno. No entanto, observam-se melhores resultados com a utilização de quimioterapia contendo esquemas baseados em antraciclinas (OLIVEIRA *et al.*, 2003; RAMONE, 2016).

O anticorpo monoclonal anti-HER-2, denominado trastuzumabe (Herceptin®), foi desenvolvido e aprovado para uso comercial. Em estudos clínicos, o Herceptin®, usado como agente terapêutico único, produziu resposta antitumoral objetiva em 15 a 20% das pacientes com metástase de carcinoma de mama, incluindo alguns casos com quimioterapia prévia (OLIVEIRA *et al.*, 2003; RAMONE, 2016). Vale ressaltar que a terapêutica com Herceptin® é efetiva apenas contra tumores que mostram expressão aumentada do receptor HER-2 na superfície celular, sendo importante a identificação de pacientes que possam se beneficiar dessa modalidade terapêutica por meio de técnicas como a imunocitoquímica (MOHAMMED *et al.*, 2018).

Por outro lado, de acordo com BALDUZZI *et al.* (2014), a administração do Herceptin® isoladamente, sequencialmente ou em combinação com a quimioterapia

pode acarretar lesão cardíaca grave, com redução da força contrátil do ventrículo esquerdo. Esse estudo relata que ocorreram 35 eventos cardíacos graves em 738 pacientes do grupo tratado com trastuzumabe e 8 eventos em 721 pacientes do grupo controle.

Os avanços da medicina representam um importante fator no aumento da sobrevida das mulheres com câncer de mama. Também têm possibilitado tratamentos mais eficientes e técnicas que viabilizam a detecção precoce da doença (VENÂNCIO, 2004). Entretanto, o impacto do câncer na qualidade de vida é devastador seja pela dor e desconforto resultantes da doença e do tratamento, seja pelas mudanças que ocorrem no âmbito psico-socio-ecômico (SILVA; HORTALE, 2006).

Segundo SILVA (2008), a primeira apreensão da mulher e da família ao receberem o diagnóstico do câncer de mama está relacionada à sobrevivência. Em seguida, vem a preocupação com o tratamento no que se refere à identidade feminina, dada a possibilidade de ocorrer perda total ou parcial da mama, queda dos cabelos, irregularidade menstrual e infertilidade. Mesmo quando o tratamento é conservatório, a indicação causa medo e crises nas pacientes, pois a mama costuma estar associada a atos prazerosos, feminilidade, sexualidade e maternidade. Há também as perdas econômicas relativas aos custos rotineiros com medicamentos, procedimentos hospitalares e outros serviços de saúde. Para muitas pacientes, a confirmação do diagnóstico evoca sentimentos de pesar, raiva e medo. O desenvolvimento da doença pode levá-las a situações de ameaça à sua integridade psicossocial, provocando incertezas quanto ao sucesso do tratamento, quando consideram o câncer uma “sentença de morte”.

De acordo com MENEZES, SCHULZ e PEREZ (2012), os primeiros sentimentos suscitados pelo diagnóstico são surpresa e tensão. Sem saber exatamente o que fazer frente à situação, as pacientes costumam experimentar uma significativa desestruturação pessoal e familiar, seguida dos sentimentos de aceitação e força e, por fim, de tentativas de identificar os fatores associados ao desenvolvimento da doença.

O fato de o câncer de mama e seu tratamento interferirem na identidade feminina geralmente provoca sentimentos de baixa autoestima, inferioridade e medo

de rejeição do parceiro ou até mesmo do filho. Além disso, as representações de dor, mutilações e ameaça de morte não desaparecem com a retirada do tumor, pois há sempre o medo da metástase e da recorrência (SILVA, 2008).

Devido à alta incidência de casos, inclusive em países desenvolvidos, a demanda por novos tratamentos e metodologias para o estudo da doença vem aumentando ao longo dos anos, a fim de melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes acometidos pela doença (SILVA; HORTALE, 2006).

2.1.1 Tumor mamário 4T1

O carcinoma mamário murino 4T1 é um modelo experimental muito utilizado na avaliação e melhor compreensão da biologia dos tumores. Está entre as subpopulações de linhagens tumorais isoladas a partir de um único tumor mamário que surgiu espontaneamente em um camundongo BALB/c (VIANA, 2014). Trata-se de uma linhagem celular altamente tumorigênica e invasiva, na qual se observam metástases espontâneas para diferentes locais, como linfonodos, fígado, pulmões, ossos e cérebro, comportando-se de forma semelhante ao câncer de mama humano (SOUZA, 2013).

2.2 Terapias complementares e alternativas

Sabe-se que o tratamento do câncer pode ser feito por meio de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea sendo que, em alguns casos, torna-se necessária a combinação de mais de um tratamento. O que pouco se sabe é que tratamentos complementares são capazes de potencializar a eficácia dos tratamentos convencionais, compondo um grupo de produtos e práticas médicas e de saúde que se enquadram na chamada medicina integrativa (NIH, 2010).

Diferente do tratamento alternativo, que substitui a prática convencional, as terapias complementares como a acupuntura, a eletroacupuntura, os suplementos nutricionais, os probióticos, a homeopatia, a fitoterapia, dentre outras são usadas em conjunto com a medicina convencional (NCCAM, 2010).

A partir da década de 1970, essas terapias popularizaram-se, aumentando de 2 a 3% ao ano aproximadamente. Essa adesão inclui os pacientes oncológicos, que passaram a buscar, nessas práticas, resposta para a insatisfação com a medicina convencional (SOUZA, 2004). A homeopatia, por exemplo, mostrou crescimento substancial de vendas nos Estados Unidos na década de 1990, com uma taxa anual de 20 a 25% (BELLAVITE *et al.*, 2005).

De acordo com um estudo americano de 2000 do *National Center for Complementary and Alternative Medicine*, 69% dos 453 pacientes com câncer que participaram do estudo haviam utilizado uma dessas terapias (RICHARDSON, 2000). Outro estudo verificou a prevalência do seu uso entre mulheres diagnosticadas com câncer de mama. Aproximadamente 58% das pacientes revelou buscar, na medicina complementar, alívio para os sintomas da doença ou para o tratamento. Entre todas as terapias complementares, a homeopatia foi utilizada em 6,2% das mulheres desde o momento do diagnóstico (REES *et al.*, 2000). Na Europa, um estudo realizado em 14 países mostrou que, na Bélgica, a homeopatia foi a terapia mais utilizada, ficando em quinto lugar em seis outros países, com 6,1% de pacientes usuários desde o recebimento do diagnóstico de câncer (MOLASSIOTIS *et al.*, 2005).

2.3 A homeopatia

Desenvolvida pelo médico alemão Christian Frederich Samuel Hahnemann, a homeopatia baseia-se na cura pelo semelhante. Para tanto, utiliza uma substância que causa, no homem, os mesmos sintomas que o paciente apresenta, com o intuito de amenizar dores e desconfortos, potencializando a capacidade de cura do próprio corpo (MONTEIRO; IRIART, 2007).

Segundo os preceitos de Hahnemann, descritos no início do século XIX, o medicamento induz uma ação primária no organismo, semelhante à doença presente. Essa ação induz uma resposta secundária, oriunda do próprio corpo, que é contrária à ação principal e ajuda, portanto, no restabelecimento da saúde. O estímulo primário é conhecido por meio de experimentação patogenética, em que se utilizam indivíduos sãos. Nessas experimentações, doses muito pequenas de

substâncias altamente diluídas e dinamizadas são experimentadas por indivíduos saudáveis que relatam toda e qualquer mudança fisiológica, comportamental ou mental (FONTES, 2005).

O temo “cH” é descrito como a diluição centesimal da substância original (c) em água ou solução hidro-alcóolica, sucussionada, conforme o método Hahnemanniano (H). O número de passagens corresponde às chamadas “potências homeopáticas” (ANVISA, 2011).

No Brasil, a Homeopatia foi introduzida, oficialmente, em 1840, por Benoit Mure, um ex-comerciante francês. No entanto, foi reconhecida como uma especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina somente em 1980 (Resolução 1000). Na Medicina Veterinária, o reconhecimento da especialidade deu-se em 1997 (Resolução 622) e, na Odontologia, em 2015 (Resolução 160) (MONTEIRO; IRIART, 2007; DENEZ, 2015; BONAMIN, 2016).

Os medicamentos homeopáticos são manipulados de acordo com procedimentos de diluição, seguidos de agitação e/ou trituração, em processo padronizado pela Farmacopéia Homeopática Brasileira (ANVISA, 2011). Com a diluição, os efeitos tóxicos desaparecem. Já a sucussão e/ou a trituração, dependendo da matéria prima, parecem modificar as propriedades físico-químicas do veículo conforme os compostos ativos inicialmente presentes (REY, 2003; ELIA; NAPOLI; GERMANO, 2007; HOLANDINO *et al.*, 2017; CARTWRIGHT, 2016, 2017).

No caso do câncer, alguns medicamentos homeopáticos têm sido utilizados tanto na forma de complexos (GUIMARÃES *et al.*, 2010), quanto como medicamento único (SATO *et al.*, 2005). Eles também ajudam o paciente a aceitar melhor a doença após o diagnóstico médico, por resgatar o equilíbrio mental e orgânico simultaneamente (REES *et al.*, 2000).

A eficácia dos medicamentos homeopáticos é demonstrada em diversos estudos e por meio de diferentes modelos experimentais, como o de SORRENTINO *et al.* (2017), no qual se observa como o uso de *Arnica montana* 1000x em pacientes recentemente mastectomizadas pode reduzir a formação de seromas pós-operatórios. Em NOGUEIRA (2015), um estudo *in vivo* com adenocarcinoma mamário 4T1, tratado com *Phytolacca decandra* em diferentes potências

homeopáticas, mostrou que o tratamento com potência 30cH induz ao retardo do crescimento do tumor medido macroscopicamente, sugerindo que essa potência pode ser uma alternativa terapêutica promissora no tratamento do câncer de mama.

Os mecanismos de ação das medicações homeopáticas ainda não estão bem esclarecidos na literatura e, por esse motivo, vêm sendo debatidos e amplamente estudados por diversos pesquisadores ao redor do mundo. Do o ponto de vista celular, estudos experimentais com medicamentos altamente diluídos demonstraram efeitos imunomoduladores de preparações homeopáticas. Já do ponto de vista biofísico, duas hipóteses são discutidas atualmente (SATO; LISTAR; BONAMIN, 2012; BONAMIN *et al.*, 2012; BONAMIN; BELLAVITE, 2015).

A primeira hipótese é a da nanofarmacologia. Embora as primeiras idéias acerca da possível participação de nanopartículas na composição de medicamentos homeopáticos tenha sido proposta em 2008 (BATTACHARYYA *et al.*, 2008), somente em 2010 foi identificada, pela primeira vez, a presença de nanopartículas metálicas em preparações diluídas acima do número de Avogadro (10^{-24} M ou 12cH) (CHICKRAMANE *et al.*, 2010, 2017; BELL *et al.*, 2015).

O conceito de que nanopartículas poderiam produzir efeitos farmacológicos é intuitivo. Contudo, não está perfeitamente de acordo com as características fenomenológicas dos efeitos dos medicamentos homeopáticos, por exemplo, a não linearidade entre potência e efeito, claramente observada em modelos experimentais e na prática clínica. Além disso, ainda não se sabe em que medida essas partículas atuariam no organismo (CHICKRAMANE *et al.*, 2010, 2017; BELL *et al.*, 2015).

Já a segunda hipótese é a da ressonância entre moléculas do solvente e do organismo exposto, baseada na teoria dos “domínios de coerência da água”, proposta, nos anos 1980, por Emilio Del Giudice e corroborada experimentalmente em vários estudos experimentais. Tal hipótese, embora menos intuitiva do que a primeira, encontra respaldo na não linearidade observada em modelos biológicos, no princípio de similitude em si e em diversos estudos físico-químicos dos medicamentos homeopáticos (BELL *et al.*, 2014; CARTWRIGHT, 2016, 2017, 2018; GUEDES; BONAMIN; CAPELOZZI, 2018; KLEIN *et al.*, 2018).

2.4 *Carcinosinum*

A eficácia dos medicamentos homeopáticos vem sendo testada em modelos *in vitro* e *in vivo*, embora, como já foi dito acima, seu mecanismo de ação ainda não esteja claramente explicado (PREETHI, 2012). Quanto ao *Carcinosinum*, ainda há poucas pesquisas publicadas que tratam especificamente dessa medicação em diversas potências, o que torna o tema de alta relevância, dado o uso frequente desse medicamento como terapia complementar do câncer em protocolos homeopáticos (AMARAL, 2015).

O nome *Carcinosinum* refere-se a toda preparação homeopática de tecidos cancerosos. Originalmente, esse medicamento foi criado a partir de um tumor mamário isolado, sendo descrito, pela primeira vez, nos anos 50, por Foubister. Hoje, no entanto, em diversos países, existem *Carcinosina* preparados de até 58 tumores diferentes. O *Carcinosinum* da Farmácia Homeopática Nelsons, em Londres, é preparado a partir de 15 tipos de tumores diferentes, bem como na Holanda, o que pode justificar os diferentes resultados alcançados pelas pesquisas (PINHEIRO; FONTES; ELETÉRIO, 2008; ELIZALDE, 2015).

O *Carcinosinum* é especialmente indicado quando há antecedentes hereditários e familiares de câncer (principalmente se existem vários casos), tuberculose, diabetes, anemia perniciosa ou uma combinação de duas ou mais dessas enfermidades. A indicação também ocorre nos casos em que há antecedentes de doenças infecciosas graves muito precocemente, na lactação ou nos primeiros meses de vida e em crianças com antecedentes de insônia (FOUBISTER, 1985; BANERJI *et al.*, 2008).

Em um modelo de estudo *in vivo* para câncer de próstata, foi utilizado o preparo de *Conium maculatum*, *Sabal serrulata*, *Thuja occidentalis* e *Carcinosinum*. Os autores observaram redução de 23% da incidência tumoral e 38% do volume tumoral, em comparação com os grupos não tratados (JONAS, 2006). PREETHI (2012) e SUNILA *et al.* (2007) constataram, em seus estudos, que o *Carcinosinum* 200cH aumenta a expressão do gene pró-apoptótico p53.

AMARAL (2015) demonstrou, em ensaio *in vivo*, conduzido com tumor de Ehrlich, que animais tratados com *Carcinosinum* 200cH apresentaram menor incidência de sintomas e por menos tempo, bem como maior sobrevida e redução de ganho de peso associado à ascite induzida pelo tumor. Além disso, o estudo demonstrou que o pico para o surgimento de sintomas nos animais tratados com outras medicações foi no dia 18 (D18) pós-inoculação do tumor, enquanto os camundongos tratados com *Carcinosinum* 200cH obtiveram um atraso na manifestação da sintomatologia para o dia 29 (D29). Em uma segunda fase, a autora mostrou que os animais tratados com *Carcinosinum* 6cH tiveram maior percentual e diversidade de sintomas, se comparados aos outros grupos, o que demonstra a importância da potência homeopática na ação pró ou anti-carcinogênica.

REMYA e KUTTAN (2015) avaliaram o efeito das preparações homeopáticas de *Thuja occidentalis* 1M, *Carcinosinum* 1M e *Ruta graveolens* 200c *in vivo* em suas diferentes potências sobre o sistema imunológico em condições normais, sobretudo pela verificação de vários fatores hematológicos. Os tratamentos mostraram pico máximo de valores para contagem total de células brancas principalmente logo após o tratamento, seguido de queda gradual, indicando a produção estimulada de leucócitos. Esse efeito foi confirmado pelo aumento da proliferação de células da medula óssea e, mais especificamente, da diferenciação de células-tronco, refletindo a estimulação do sistema hematopoiético. Os autores sugerem também atividade imunomoduladora de preparações homeopáticas, quando em alta diluição. As medicações podem estimular tardiamente o sistema imunológico efetor, que serão mediadas pela ativação combinada e regulada do sistema humoral e pelas respostas imunes mediadas por células.

Em relação à citotoxicidade, SUNILA et al. (2007) compararam a atividade de dez medicamentos e suas respectivas tinturas-mãe. Os resultados mostraram, em curto prazo, que algumas das preparações dinamizadas apresentaram ações citotóxicas significativas contra diversas linhagens celulares de câncer *in vitro* e, às vezes, a atividade foi maior do que a da própria tintura-mãe. No caso especificamente do *Carcinosinum*, o efeito citotóxico foi maior na potência 200cH do que na 30cH, indicando que a dinamização induz a ação citotóxica desse medicamento de forma não linear.

Outro estudo que compara o efeito da *Thuya occidentalis* e do *Carcinosinum* sobre linhagens de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) *in vitro* sugere que as medicações em questão poderiam exercer efeito citotóxico por expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, bem como induzir a cascata apoptótica (FRENKEL et al., 2010). Por outro lado, um estudo realizado com *Natrum sulphuricum* 30cH e *Carcinosinum* 200cH *in vivo*, utilizados de forma intermitente contra o hepatocarcinoma induzido por azo corante, resultou em efeitos terapêuticos sinérgicos (NANDINI; PATHIKRIT; KHUDA-BUKHSH, 2009).

3. JUSTIFICATIVA

Diante das evidências observadas, como o aumento da incidência do câncer e a procura por terapias complementares na oncologia, incluindo a homeopatia, faz-se necessário investigar tanto os prováveis mecanismos envolvidos, quanto a otimização do uso de tais medicamentos, na oncologia prática, como terapia complementar aos agentes anti-neoplásicos clássicos.

Como descrito anteriormente, AMARAL (2015) evidenciou que os animais inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com *Carcinosinum* 200cH apresentaram menor incidência de sintomas do que outros grupos. Por outro lado, os animais tratados com *Carcinosinum* 6cH foram os que apresentaram maior percentual e diversidade de sintomas, se comparados com os outros grupos experimentais. O mesmo estudo revelou outro aspecto importante: mudanças claras de efeito entre as potências homeopáticas utilizadas. De acordo com os resultados, enquanto a potência 6cH apresentou piora em todos os parâmetros analisados, a potência 200cH mostrou benefícios em relação à qualidade de vida do hospedeiro. A mistura de ambas as potências identificou mudanças na relação das células tumorais com seu microambiente e no balanço de subtipos de linfócitos T esplênicos.

Considerando a escassez de literatura sobre esse medicamento, o presente estudo foi proposto como forma de dar continuidade aos trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa (AMARAL, 2015), com ênfase na indução de

apoptose e em eventuais mudanças fenotípicas do adenocarcinoma mamário murino 4T1, após tratamento *in vitro* com *Carcinosinum*.

4. OBJETIVO

Identificar possíveis alterações fenotípicas, incluindo apoptose, expressão de HER-2 e habilidades metastáticas nas células 4T1 após o tratamento com *Carcinosinum in vitro*, em diferentes potências homeopáticas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Preparo dos medicamentos

Assim como o veículo (água não dinamizada), o *Carcinosinum* 12cH, 30cH e 200cH foi preparado no próprio laboratório, 24 horas antes do experimento, em água ultra-pura (SIGMA®) e frasco âmbar estéreis, a partir de matrizes homeopáticas preparadas nas potências 11cH, 29cH e 199cH, obtidas de farmácia credenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os lotes, a data de fabricação e de validade encontram-se descritos no **Quadro 1**.

Quadro 1: Descrição das matrizes: lote, data de fabricação e validade.

Medicamento	Lote	Data de fabricação	Validade
<i>Carcinosinum</i> 11cH	0228245-0002	20/02/2018	20/02/2020
<i>Carcinosinum</i> 29cH	0228245-0003	20/02/2018	20/02/2020
<i>Carcinosinum</i> 199cH	0228245-0004	20/02/2018	20/02/2020

A sucussão dos frascos foi realizada de forma automatizada, em braço mecânico Denise (Autic®), conforme as normas descritas na Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3ª edição (ANVISA, 2011). Toda manipulação dos medicamentos foi feita em fluxo laminar. Os medicamentos foram embalados em papel alumínio e armazenados, separadamente, em ambiente livre de campo magnético e variações de temperatura. Antes de serem aplicados sobre as culturas celulares, os medicamentos e o veículo (controle) foram filtrados em filtro de malha 0.22 micrômetros (Millipore®), para completa esterilização.

5.2 Codificação dos frascos

Os frascos dos medicamentos na diluição final e do veículo foram codificados antes do início do estudo por um funcionário do laboratório que não se encontrava envolvido na experimentação. Assim, todas as análises foram feitas em cego. Durante todo o ensaio, os códigos foram mantidos em envelope lacrado, aberto apenas o após o término da análise estatística.

5.3 Cultura de células 4T1

As células de adenocarcinoma mamário 4T1 foram cedidas pelo Departamento de Imunologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Posteriormente, foram distribuídas em garrafas de cultura e incubadas em meio R10 (90% de RPMI e 10% SFB), a 37°C e atmosfera 5% de CO₂, por 20 minutos, sempre em fluxo laminar para expansão. Alíquotas de 1,0 mL foram congeladas em temperatura de -80°C em meio de congelamento (90% SFB e 10% de DMSO), para utilização nos diferentes experimentos.

Durante o descongelamento das células, efetuado em temperatura ambiente, todo o conteúdo do tubo de congelamento transferiu-se para tubos Falcon de 15 mL, contendo 9,0 mL de RPMI 1640 (GIBCO, USA). As células já suspensas foram centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos. Após o descarte dos sobrenadantes, elas foram ressuspensas em meio R10, contadas em câmara de Neubauer por meio do

método do Azul de Tripán e semeadas, para aderir à superfície da garrafa, na quantidade de 1×10^5 células por garrafa pequena, contendo 5,0 mL de meio R10. Foram mantidas dessa forma, em 5 garrafas pequenas (**Quadro 2**), sendo tratadas com 500 μ L dos medicamentos a serem testados ou do veículo, todos estéreis, em volume correspondendo a 10% do volume total do meio. As células foram incubadas com os medicamentos por 24 horas e analisadas.

Após esse período, o sobrenadante foi retirado das 5 garrafas pequenas foram aliqüotadas em amostras de 1,0 mL em 5 microtubos, para análise posterior. As células foram removidas do fundo da garrafa com 1,0 mL de tripsina diluída em meio RPMI 1640 e com auxílio de *cell scraper*, sendo lavadas em PBS gelado. Parte das células em suspensão foi utilizada para confecção de esfregaços, em quintuplicata, sendo as células fixadas com metanol absoluto por 15 minutos e, após secas, guardadas em freezer até sua posterior utilização.

5.4 Análise da incidência de apoptose

A contagem de células em apoptose foi feita pelo sistema Countess® (Life Technologies, Oregon, USA), usando um kit Alexa Fluor® 488 – Annexin V apoptosis (Life Technologies, Oregon, USA), conforme instruções do fabricante.

Quadro 2: Descrição da composição dos diferentes tratamentos nas placas de cultivo.

1	Cultura 4T1 sem tratamento
2	Cultura 4T1 + Água não dinamizada (veículo)
3	Cultura 4T1 + <i>Carcinosinum</i> 12cH
4	Cultura 4T1 + <i>Carcinosinum</i> 30cH
5	Cultura 4T1 + <i>Carcinosinum</i> 200cH

5.5 Morfologia celular por meio de Hematoxilina – Eosina e Giemsa

A morfologia das células 4T1 foi monitorada por meio de dois métodos de coloração. As células previamente fixadas em metanol absoluto foram coradas pelos métodos Hematoxilina – Eosina (HE) e Giemsa. Logo após a lavagem com água destilada e a secagem, as lâminas foram montadas em *Entelan*® (Merck, Darmstadt, Germany), para análise ao microscópio ótico (NIKON E200, Tokyo, Japan). Os seguintes parâmetros de viabilidade celular foram observados: vacuolização citoplasmática e padrões de degeneração citoplasmáticos e nucleares.

5.6 Expressão de HER-2 por meio de Imunocitoquímica

As lâminas de esfregaços previamente fixadas e codificadas foram encaminhadas para um laboratório comercial, o *Laboratório de Apoio em Patologia Cirúrgica* (APC-LAB), para que a marcação para HER-2 fosse realizada. A análise das lâminas em microscópio ótico deu-se no Centro de Pesquisa da Universidade Paulista (UNIP).

Após teste piloto para determinação de origem e diluição ideais, foi escolhida a diluição de 1:200 do anticorpo policlonal DAKO-Agilent (California, USA), lote 20027851B, como padrão. Após a imunomarcação com anticorpo secundário ligado a polímero e peroxidase, células positivas foram fotografadas aleatoriamente em fotomicroscópio acoplado à câmera digital (NIKON E200, Tokyo, Japan), para análise descritiva da morfologia e da intensidade de marcação.

5.7 Atividade enzimática das metaloproteinases por meio da técnica de Zimografia

Dentre todas as metaloproteinases (MMP) conhecidas, as MMP-9 (gelatinases) têm sido consistentemente associadas à agressividade, ao potencial metastático e ao prognóstico desfavorável das neoplasias malignas. Portanto, têm papel crucial na progressão tumoral, atuando diretamente sobre os componentes da

membrana basal (KUPAI *et al.*, 2010). Por esse motivo, foram escolhidas como marcadores de potencial metastático. Considerando que a banda de atividade proteolítica das MMPs é incolor no gel a fresco, na imagem negativa do mesmo, quanto maior a densidade óptica, maior a atividade da MMP (MEDEIROS; GOMES; FARES, 2012).

A técnica de zimografia consiste em uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 10%, que permite detectar a atividade enzimática das metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs) a partir da degradação de seu substrato copolimerizado no gel, com dodecil sulfato de sódio (SDS) e com o substrato preferencial da enzima em análise. A aplicação de uma corrente elétrica possibilita a migração das MMPs no gel e sua separação pela diferença do tamanho molecular. Durante o arraste das enzimas na eletroforese, o SDS permite a inativação / desnaturação das MMPs no gel. Após a eletroforese, as enzimas são reativadas / renaturadas pela remoção do SDS, lavando-se o gel com uma solução aquosa 2,5% de Triton X-100, um detergente não iônico. Uma vez que as formas latentes possuem peso molecular diferente das formas ativas, a etapa de reativação / renaturação enzimática permite identificar isoladamente ambas as formas das MMPs (KUPAI *et al.*, 2010).

A técnica foi realizada no Laboratório do Centro de Pesquisa da UNIP, para evidenciação das MMP-2 e MMP-9. Dado que a MMP-2 tem ocorrência ampla em vários tipos celulares e papel fisiológico na maioria dos casos, a mesma foi escolhida como controle interno da técnica. Após a renaturação das MMPs fixadas no gel a partir das amostras de sobrenadante, o gel foi incubado por 20 horas, a 37°C, sob constante agitação, em uma solução de cloreto de zinco, contendo Tris 50 mM, para que as endopeptidases degradassem o substrato co-polimerizado no gel. Em seguida, o gel foi corado com uma solução de azul brilhante de Coomassie 0,5%, por 30 minutos e descorado em uma solução de álcool metílico 500 mL, ácido acético glacial 100 mL e água destilada 400 mL, por 20 minutos, em duas repetições, até a percepção de bandas incolores, em contraste com o fundo azul do gel. O gel foi armazenado em água destilada a 4°C, por um dia, para melhorar o contraste. A captura das imagens dos géis foi realizada em alta resolução, em fotodocumentador Biorad GelDoc XR+ com Software ImageLab.

A atividade proteolítica foi analisada qualitativamente, por inspeção da área e da tonalidade de cinza presente em cada banda, após captura do negativo da imagem em fotografia digital.

5.8 Determinação do perfil de citocinas pela técnica CBA

Dado que um dos mecanismos de escape das células tumorais à resposta imune é a indução de inflamação local, a investigação da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas próprias células tumorais é outra ferramenta importante de caracterização fenotípica.

As amostras de sobrenadantes das células 4T1, após seus respectivos tratamentos, incluindo o grupo controle, foram coletadas e congeladas a -80°C , para determinação de citocinas relacionadas aos padrões Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-17, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α), utilizando a técnica *Cytometric Bead Array* - CBA (BD-Biosciences, New Jersey, USA). Para isso, 50 μL de cada amostra (tanto da curva padrão, quanto das amostras a serem analisadas) foram incubadas com 50 μL de uma mistura de *beads* de captura e anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo phycoerythrin (PE). As amostras foram incubadas por 2 horas, em temperatura ambiente e protegidas da luz por cobertura com papel alumínio. Após lavagem, a aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo, utilizando FACS Accure (BD Biosciences, New Jersey, USA) e o software FACS Diva (BD Biosciences, New Jersey, USA).

5.9 Ética

Por se tratar de um estudo *in vitro*, que utilizou linhagens celulares de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e não de animais, essa pesquisa não necessitou ser encaminhada ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Paulista.

5.10 Delineamento experimental

O delineamento experimental (**Figura 1**) foi realizado de forma que todas as análises em quadruplicata fossem provenientes de uma mesma população celular e igualmente tratada. Tal desenho experimental possibilitou reduzir eventuais vieses associados à instabilidade genética das células, cujas características fenotípicas podem mudar entre diferentes passagens de replicação. Dessa forma, os resultados obtidos foram complementares e facilmente comparáveis entre si.

5.11 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com uso do Software Excel 2010 e GraphPad Prism, versão 6.0, para o Windows™, a fim de avaliar o efeito do tratamento sobre a taxa de apoptose e sobre a quantidade de citocinas produzidas. Para isso, empregou-se uma análise de variância de um fator (ANOVA de um fator), com pós teste de Tukey, quando necessário. Os dados foram previamente avaliados, para inspeção de normalidade e homogeneidade de variâncias, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para todos os cálculos, adotaram-se níveis de significância $\alpha=0,05$. Valores de chance de erro $p\leq 0,05$ foram considerados significativos.

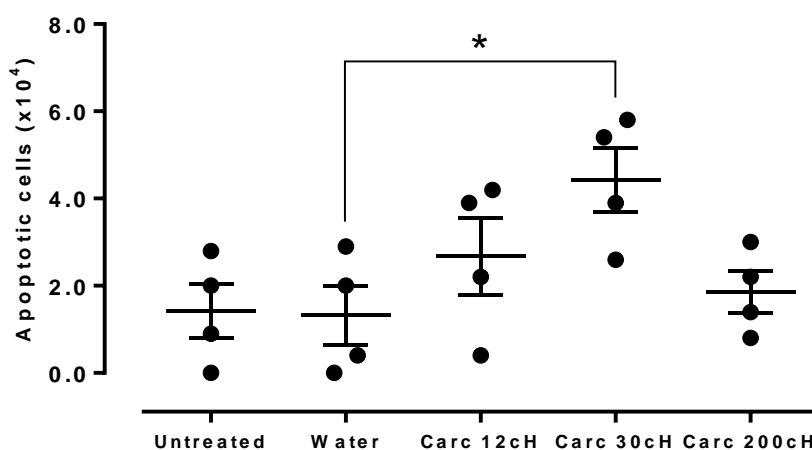
Figura 1: Esquema representativo do delineamento experimental. Cada item representa uma fonte de células com o mesmo número de passagens (garrafa de cultura). Diferentes tratamentos foram aplicados, para a obtenção das amostras.

CULTURA DE CÉLULAS 4T1	Sem tratar	<ul style="list-style-type: none"> • 1×10^5 células divididas em 4 tubos (quadruplicata) para contagem de células em apoptose. • Células remanescentes distribuídas em esfregaços – quintuplicata (HE, GIEMSA e imunocitoquímica). • Sobrenadante dividido em 5 criotubos (quintuplicata) com 1mL (para zimografia e quantificação de citocinas por CBA).
	Água não dinamizada	<ul style="list-style-type: none"> • 1×10^5 células divididas em 4 tubos (quadruplicata), para contagem de células em apoptose. • Células remanescentes distribuídas em esfregaços – quintuplicata (HE, GIEMSA e imunocitoquímica). • Sobrenadante dividido em 5 criotubos (quintuplicata) com 1mL (para zimografia e quantificação de citocinas por CBA).
	<i>Carcinosinum</i> 12cH	<ul style="list-style-type: none"> • 1×10^5 células divididas em 4 tubos (quadruplicata), para contagem de células em apoptose. • Células remanescentes distribuídas em esfregaços – quintuplicata (HE, GIEMSA e imunocitoquímica). • Sobrenadante dividido em 5 criotubos (quintuplicata) com 1mL (para zimografia e quantificação de citocinas por CBA).
	<i>Carcinosinum</i> 30cH	<ul style="list-style-type: none"> • 1×10^5 células divididas em 4 tubos (quadruplicata), para contagem de células em apoptose. • Células remanescentes distribuídas em esfregaços – quintuplicata (HE, GIEMSA e imunocitoquímica). • Sobrenadante dividido em 5 criotubos (quintuplicata) com 1mL (para zimografia e quantificação de citocinas por CBA).
	<i>Carcinosinum</i> 200cH	<ul style="list-style-type: none"> • 1×10^5 células divididas em 4 tubos (quadruplicata), para contagem de células em apoptose. • Células remanescentes distribuídas em esfregaços – quintuplicata (HE, GIEMSA e imunocitoquímica). • Sobrenadante dividido em 5 criotubos (quintuplicata) com 1mL (para zimografia e quantificação de citocinas por CBA).

6. RESULTADOS

6.1 Apoptose

Por meio do método da identificação de Anexina V, pôde-se observar maior incidência de apoptose nas células 4T1 que receberam o tratamento com *Carcinosinum* 30cH, em comparação com o grupo que recebeu o tratamento com água não dinamizada (**Figura 2**).



$$F(4,15) = 3,456, *p=0,034 \text{ RMSSE}= 0,930$$

Figura 2. Incidência de apoptose em células 4T1 mantidas em monocultura por 24 horas, em função dos diferentes tratamentos.

6.2 Morfologia celular e expressão de HER-2

Os achados morfológicos obtidos por citologia a partir dos esfregaços (preparados a partir de células em cultura ressuspendidas) estão representados na **Figura 3**.

Após a coloração por hematoxilina-eosina e Giemsa, observou-se que as células 4T1 apresentaram um formato, muitas vezes, arredondado, com grande relação núcleo-citoplasma e nucléolos evidentes, características típicas de tumores malignos. Porém o espriamento citoplasmático sobre a lâmina foi mais evidente

naquelas tratadas com *Carcinosinum* 200cH. Os núcleos, em geral, apresentam formato arredondado, mas, por vezes, observa-se um aspecto ovóide, independente do tratamento. As células tratadas com *Carcinosinum* 30cH apresentaram características típicas de células em apoptose, com formação de corpos apoptóticos (**Figura 3**).

Já na marcação de HER-2 por imunocitoquímica, foram observados diferentes padrões de marcação dessa proteína. As células que não foram tratadas apresentaram padrão irregular de expressão de HER-2 na membrana, o qual foi ainda mais evidente nas células tratadas com *Carcinosinum* 200cH. Por outro lado, as células tratadas com *Carcinosinum* 12cH e 30cH apresentaram menor padrão de expressão de HER-2, por vezes, negativo (Figura 3).










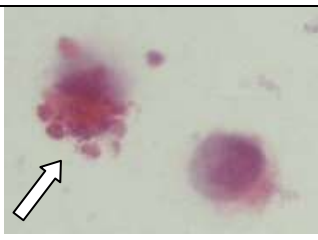





Tratamento	Hematoxilina-eosina	Giemsa	Imunocitoquímica para HER-2
Sem tratamento			
Veículo (água)			
<i>Carcinosinum</i> 12cH			
<i>Carcinosinum</i> 30cH			
<i>Carcinosinum</i> 200cH			

Figura 3. Fotomicrografias de células 4T1 em esfregaços obtidos da ressuspensão celular, fixados com metanol absoluto por 15 minutos e corados pelos métodos hematoxilina-eosina, Giemsa e imunocitoquímica para HER-2. As setas pretas indicam a positividade para HER-2 em diferentes graus. A seta branca indica célula com morfologia típica de apoptose. Imagens obtidas com lente objetiva de 40x.

6.3 Metaloproteinasas

A análise qualitativa do sobrenadante das culturas pelo método da zimografia (**Figura 4**) permitiu observar que a área de digestão do controle interno, MMP-2 pró-ativada, foi uniforme entre as amostras. A amostra sem tratamento (ST) apresentou maior área e intensidade de digestão na banda MMP-9 pró-ativada, enquanto a amostra *Carcinosinum* 30cH (Ca 30) apresentou menor área e intensidade de digestão nessa banda, indicando provável redução na expressão dessa enzima, ainda na forma inativa, após o tratamento das células com esse medicamento.

Em contrapartida, a área correspondente à digestão induzida pela MMP-9 ativada foi relativamente homogênea entre os diferentes tratamentos, sendo menor a intensidade na amostra que não recebeu nenhum tratamento (ST), mostrando que a ativação é um efeito inespecífico observado também na amostra de sobrenadante de células tratadas apenas com água.

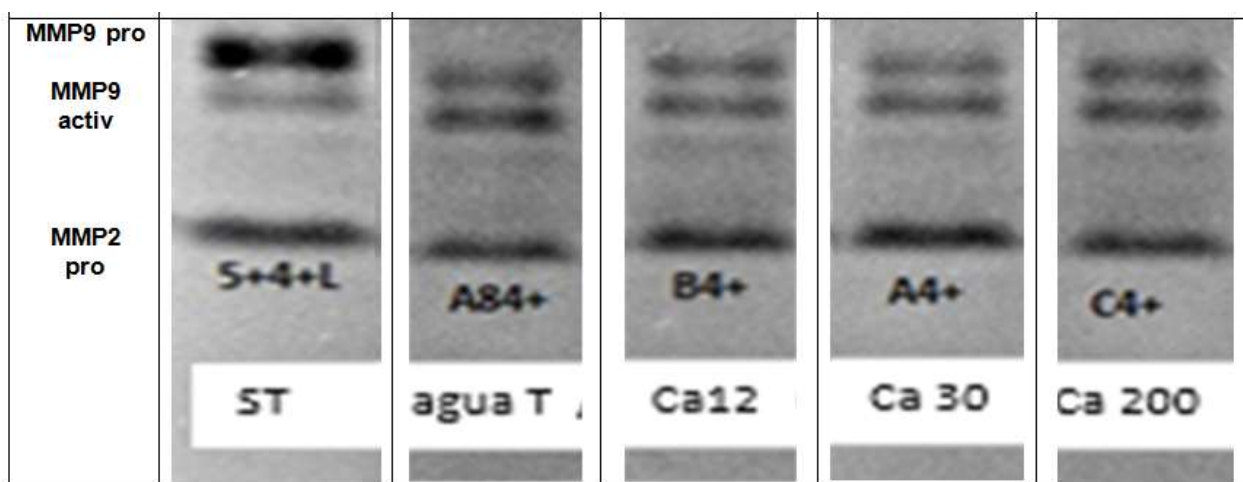


Figura 4. Bandas de digestão do gel obtidas em ensaio de zimografia. A atividade gelatinolítica da enzima MMP-9 nos estágios pró-ativada e ativada foi comparada ao controle interno (MMP-2 pró-ativada) em cada tratamento. Os códigos em preto representam a identificação das amostras, analisadas em cego. ST = sem tratamento; água T = água; Ca 12 = *Carcinosinum* 12cH; Ca 30 = *Carcinosinum* 30cH; Ca 200 = *Carcinosinum* 200cH.

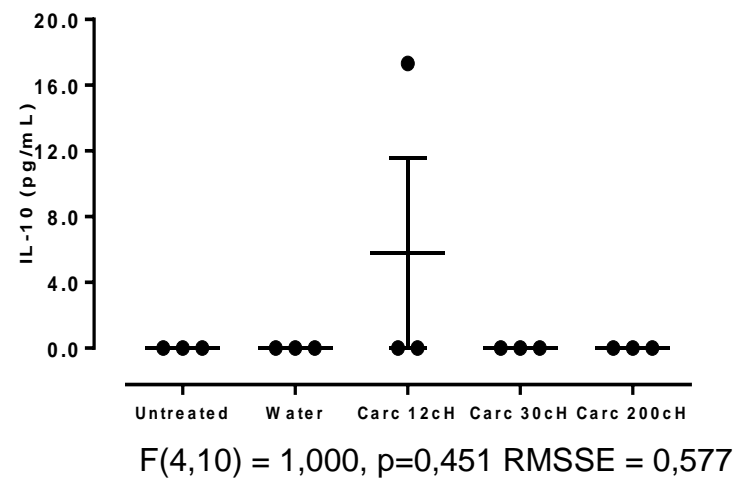
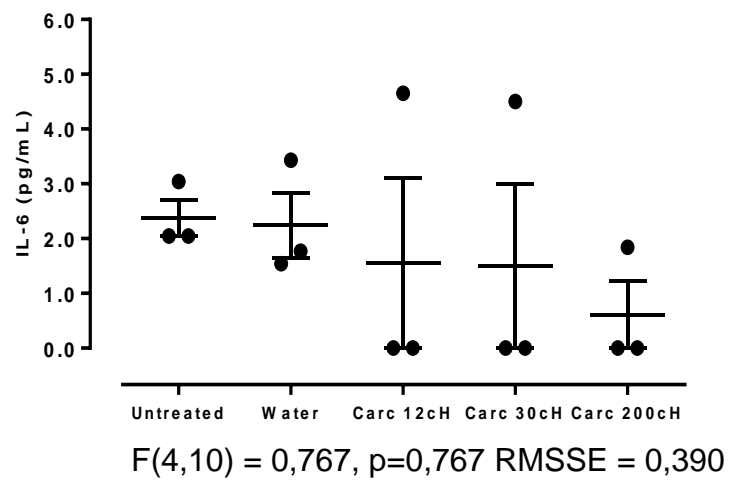
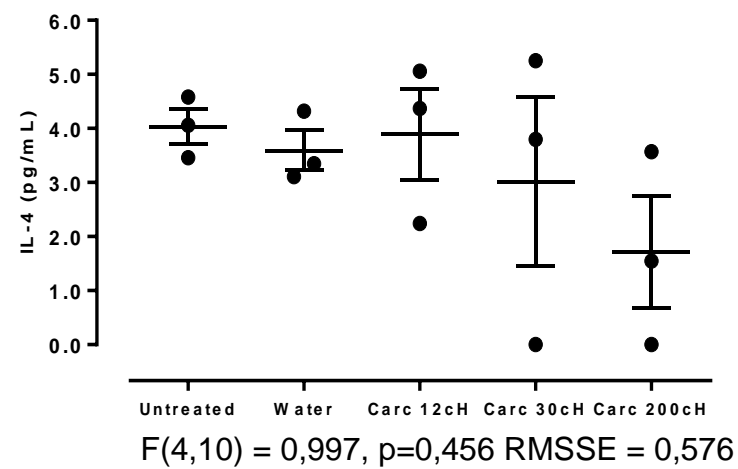
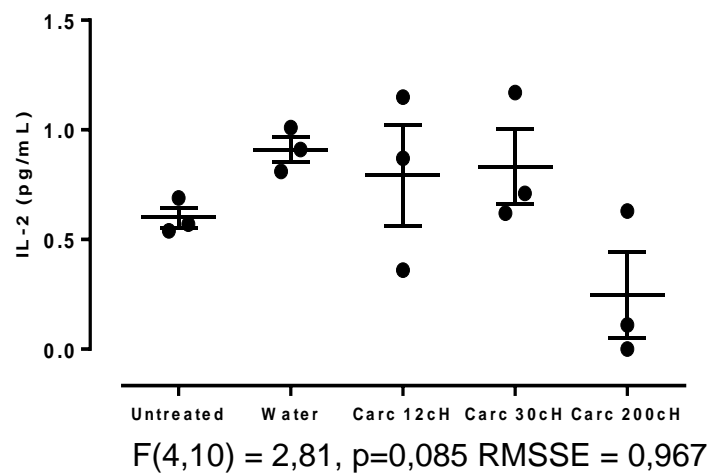
6.4 Avaliação da produção de citocinas das células 4T1 pelo método CBA

Em todos os tratamentos, observou-se a produção das seguintes citocinas pró-inflamatórias: IL-2, IL-4, IL-6, INF- γ e TNF- α . Contudo, não houve significância estatística entre eles. Há certa tendência do *Carcinosinum* 200cH de reduzir a produção de citocinas inflamatórias, mas sem significância estatística, em função da grande variabilidade de valores (**Figura 5**).

No **Quadro 3**, estão representados todos os resultados obtidos no presente estudo.

Quadro 3: Representação dos resultados obtidos.

	Sem tratamento	Água (veículo)	Ca 12cH	Ca 30cH	Ca 200 cH
Apoptosis	-	-	-	↑	-
HER-2	+	-	-	-	+++
MMP-9 Pro	++++	++	++	+	++
MMP-9 Ativada	+	+++	++	++	+++
Citocinas	-	-	-	-	-



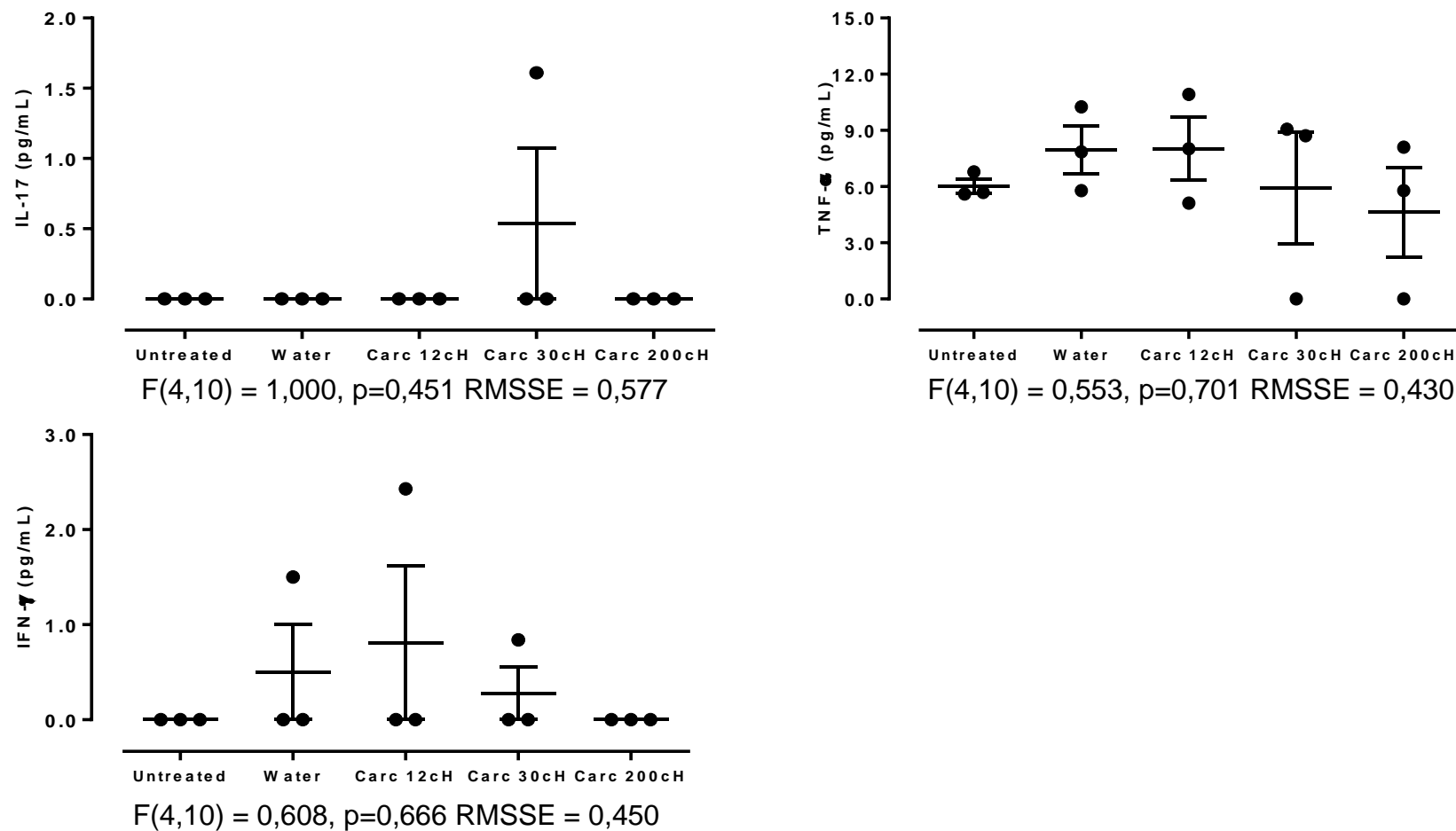


Figura 5. Representação do perfil de citocinas (pg/mL) relacionadas aos padrões Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ) pela técnica Cytometric Bead Array – CBA.

7. DISCUSSÃO

Os resultados observados neste modelo experimental *in vitro* demonstraram que o tratamento de células 4T1 em diferentes diluições homeopáticas de *Carcinosinum* está associado a mudanças de certos padrões fenotípicos, incluindo maior ocorrência de apoptose e mudanças nos padrões de expressão de HER-2 e MMP-9, em função da diluição utilizada.

Existem indicações na literatura de indução de apoptose em tumores após tratamento com *Carcinosinum* 200cH *in vivo*, associado ao aumento da expressão do gene p53, um importante gene que induz a apoptose em células incapazes de reparar danos ao DNA (PREETHI *et al.*, 2012). Contudo, os efeitos do *Carcinosinum* sobre a resposta do sistema imune ainda são controversos (REMYA; KUTTAN, 2015).

FRENKEL *et al.* (2010) realizaram um estudo *in vitro*, com objetivo de determinar se os medicamentos prescritos na clínica oncológica homeopática poderiam ter efeitos sobre diferentes linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e sobre células de mama normais (HMLE). Foram testados os seguintes medicamentos: *Carcinosinum* 30cH; *Phytolacca* 200cH; *Conium maculatum* 3cH e *Thuja occidentalis* 30cH. Os principais resultados desse estudo indicaram uma ação seletiva dos medicamentos em células tumorais, induzindo atraso no processo de divisão celular e apoptose. Esses efeitos foram acompanhados por mudanças na expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular; pela ativação da caspase-7, importante enzima envolvida no processo apoptótico, dentre outras alterações celulares envolvidas com a inibição da divisão celular. Entre os quatro medicamentos investigados, o *Carcinosinum* e a *Phytolacca* revelaram efeitos inibitórios mais evidentes.

Um estudo anterior, realizado *in vivo*, evidenciou que camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com *Carcinosinum* 200cH apresentaram melhor resultado clínico e aumento da sobrevida. Ainda que não impliquem em redução da massa tumoral, tais efeitos podem levar à melhor qualidade de vida. Por outro lado, ao tratar os animais com uma potência menor,

Carcinosinum 6cH, observaram-se efeitos indesejados, como edema no local da inoculação do tumor e maior incidência de piloereção e hipertermia, sugerindo certa atividade inflamatória local e sistêmica, com prováveis mudanças do microambiente tumoral (AMARAL, 2015; BONAMIN *et al.*, 2019). Ao fazer uma conjectura desses resultados com o presente estudo, compreende-se que o significado biológico da ação de cada diluição homeopática específica depende do contexto no qual os elementos estão inseridos. Assim, o estudo *in vitro* é importante, para demonstrar os efeitos do medicamento diretamente sobre as células tumorais, sem a intervenção da resposta imune local. Por outro lado, a presença de células imunitárias e de outros elementos do microambiente tumoral *in vivo* podem implicar em mudanças no desfecho do tratamento, que não seriam observadas *in vitro*.

O microambiente tumoral compreende uma coleção de vasos sanguíneos, matriz extracelular e células do tecido conjuntivo, capazes de secretar fatores de crescimento e quimiocinas que atraem outras células, como leucócitos, sendo os mesmos chamados de leucócitos infiltrantes de tumores (TIL). O perfil dos TILs encontra-se, frequentemente, associado ao prognóstico da doença (BONAMIN *et al.*, 2019; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). Estudos têm demonstrado que interações das células tumorais com os elementos celulares e/ou moleculares presentes no microambiente tumoral são determinantes tanto na evolução, quanto no crescimento e na progressão tumoral (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010), logo, na expressão de algumas características fenotípicas das células tumorais. Por esse motivo, TANG, QIAO e FU (2016) entendem que a eficácia das imunoterapias depende do microambiente tumoral.

Os resultados obtidos com *Carcinosinum* 30cH, neste estudo, corroboram aqueles descritos por FRENKEL *et al.* (2010), no que diz respeito à maior ocorrência de apoptose. Contudo, os efeitos benéficos, descritos por AMARAL (2015), para o *Carcinosinum* 200cH não tiveram correspondência com os dados obtidos no presente estudo, uma vez que a expressão de HER-2 – um marcador de pior prognóstico (OLIVEIRA *et al.*, 2003) – foi maior nas células tratadas com essa diluição. Por outro lado, a superexpressão desse receptor também estaria envolvida com uma possível imunogenicidade do tumor, cujas implicações clínicas demandam estudos adicionais.

Não foram encontrados, na literatura, dados que correlacionassem o tratamento com *Carcinosinum* e a expressão de HER-2. Porém, o estudo de NOGUEIRA (2015), realizado com *Phytolacca decandra in vivo*, demonstrou que tais preparações homeopáticas poderiam modificar o padrão de expressão desse receptor em função da diluição homeopática testada, mas de maneira não linear.

Mudanças na expressão de proteínas específicas, bem como de outras variações fenotípicas são comuns em células malignas, face à instabilidade gênica. No caso da 4T1, sabe-se que a comunicação intercelular por exossomos pode modificar a fenotipia e a progressão tumoral (SHI et al., 2015). Para evitar a interferência de tais flutuações nas propriedades fenotípicas dessas células, um cuidado adicional foi tomado nesse estudo: a replicação das amostras obtidas da mesma população e da mesma passagem, para que as células estudadas fossem o mais homogêneas possível.

Outro resultado significativo diz respeito à diminuição das bandas referentes à MMP-9 pró-ativada, presente no sobrenadante de células tratadas com *Carcinosinum* 30cH. Ela sugere menor expressão gênica dessa proteína, portanto, menor potencial metastático. A confirmação desse achado em estudos futuros, envolvendo modelos experimentais específicos para análise de potencial metastático, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é fundamental para compreender a relevância clínica desse medicamento. O modelo da zimografia mostrou-se extremamente sensível para esse fim, mas também foram observados efeitos inespecíficos sobre a ativação da MMP-9, dado que a simples manipulação da cultura celular, como a inserção do veículo (água), foi capaz de ativar tais enzimas.

As metástases são semeadas por células tumorais com propriedades moleculares únicas, que podem funcionar como células tronco, na sua capacidade de iniciar e propagar focos de crescimento tumoral distantes do sítio primário (HERMANN et al., 2007; OSKARSSON et al., 2014). QUAIL e JOYCE (2013) demonstraram que a progressão do tumor e a formação de metástases ocorrem também devido às interações das células tumorais com células ou componentes do microambiente onde o tumor desenvolve-se.

Para que ocorra o processo de invasão e para que as células de câncer de mama manifestem seu potencial maligno, elas devem desenvolver a capacidade de quebrar e dissolver a matriz extracelular (MEC), particularmente, a membrana basal delimitadora (MB). A degradação da MB e MEC pericelular é catalisada pela ação combinada de várias classes de enzimas que degradam MEC, sendo uma delas as chamadas “metaloproteinases de matriz” (MMPs). As MMPs agem como possíveis mediadores de invasão e metástase em alguns tipos de câncer. A MMP-9, por exemplo, está superexpressa, sobretudo, em tumores invasivos (BERNHARD; GRUBER; MUSCHEL, 1994; HUA; MUSCHEL, 1996; LEE; HA; KIM, 2012; ZHANG *et al.*, 2017).

A MMP-9 ativada está envolvida na síntese e degradação da matriz extracelular e fragmenta laminina e colágeno IV, componentes fundamentais da MB. Para descrever sua participação, é preciso detectar e quantificar sua atividade proteolítica. Originalmente, a zimografia foi desenvolvida usando gelatina como substrato, para mensurar a atividade enzimática das gelatinases, as MMP-2 e MMP-9 (KUPAI *et al.*, 2010).

Utilizando a técnica de zimografia, LEE, HA e KIM (2012) observaram que o uso dependente da dose de revesterol previne a progressão do tumor de células 4T1 pela inibição da expressão de MMP-9 e suprime mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α . VASCONCELOS *et al.* (2013), por sua vez, utilizaram como marcador imunohistoquímico a MMP-9, a fim de correlacionar sua expressão com a gradação histológica em 28 casos de carcinoma bucal de células escamosas. Em 24 casos de tumores agressivos, a MMP-9 foi positiva, sugerindo que a expressão da MMP-9 pode ser um fator preditivo de mau prognóstico. KAWAMATA *et al.* (1995) verificaram que a indução da expressão de MMP-2 em uma linhagem de células de carcinoma de bexiga de rato aumentou a capacidade de metástase desse tumor. Também XU *et al.* (2013) relataram que a expressão de MMP-2 foi significativamente maior em lesões malignas de mama, do que em lesões benignas.

ZHAO *et al.* (2013) e LIU *et al.* (2013) demonstraram que pacientes com câncer de mama triplo-negativo (aquele que não apresenta os três biomarcadores mais comuns: receptor de estrogênio, receptor de progesterona e proteína HER-2) apresentavam elevada expressão de MMP-9, resultando em pior prognóstico.

Resultados similares também foram obtidos por CUPIC et al. (2011) e ZENG et al. (2013). Por outro lado, JOBIM et al. (2008) analisaram a expressão de MMP-9 e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em um grupo de pacientes com câncer de mama primário e os resultados obtidos não demonstraram correlação entre a expressão da MMP-9 e do VEGF.

Embora muitos estudos venham demonstrando o papel das células do sistema imune no microambiente tumoral, ainda não estão bem estabelecidos quais são os mecanismos pelos quais essas células favorecem a alteração fenotípica das células tumorais (NASCIMENTO, 2014). As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, que participam da comunicação entre as células. No ambiente tumoral, são sintetizadas tanto por células do sistema imune, quanto por células tumorais e do estroma (células endoteliais, fibroblastos). Além de regular a proliferação, sobrevivência, diferenciação, ativação, migração e morte celular, essas moléculas podem modular a resposta antitumoral. Entretanto, em processos inflamatórios crônicos, podem também induzir à transformação maligna de vários tipos celulares, dependendo de fatores como concentração, intensidade da expressão de receptores e estado de ativação de células adjacentes (ZAMARRON; CHEN, 2011).

Os resultados obtidos mostraram que não houve mudança na produção de citocinas pelas células 4T1 em função do tratamento *in vitro*. Contudo, estudos futuros *in vivo* deverão ser realizados, já que o microambiente tumoral também tem papel preponderante nesse processo.

Por ser encontrado em muitos tipos de tumores humanos produzidos tanto por células tumorais, quanto por células do estroma, o TNF- α encontra-se entre as citocinas mais estudadas no microambiente tumoral. Níveis elevados dessa citocina estão presentes em pacientes com câncer avançado (BALKWILL, 2009; BALKWILL; MANTOVANI, 2012). Em relação ao papel da IL-10 no câncer, ele ainda não está bem definido. A IL-10 é uma citocina multifuncional que exibe propriedades imunossupressoras e anti-angiogênicas, desempenhando, assim, um papel duplo e controverso na carcinogênese humana, como fator promotor e inibidor de tumor (MOCELLIN *et al.*, 2003; MOCELLIN; MARINCOLA; YOUNG, 2005). GARRIDO et al. (2015) relataram, em seu estudo, que o aumento na secreção de IL-10 pelo tecido mamário neoplásico cria um ambiente tumoral favorável para a progressão

tumoral, possivelmente, tanto pela supressão de citocinas com ação antitumoral, como o IFN- γ e a IL-2, como pelo aumento linfócitos T regulatórios, que ocorrem na presença de IL-10. Em relação à IL-17A, os níveis elevados dessa citocina também estão significativamente associados a prognóstico ruim (KAUR *et al.*, 2018). ZHUANG-WEI *et al.* (2018) mostraram que os níveis séricos de IL-10 e IL-17A aumentam significativamente em indivíduos com hiperplasia atípica e carcinoma ductal, bem como em pacientes com estágio clínico mais grave do tumor. Além disso, altos níveis séricos de TGF- α foram associados a tumores HER-2 positivos.

8. CONCLUSÃO

O conjunto dos dados sugere que o tratamento de células 4T1 *in vitro* com diluições homeopáticas de *Carcinosinum* produz alterações fenotípicas importantes para o desenvolvimento tumoral, tais como: aumento do número de células positivas para Anexina V (células em apoptose), expressão irregular de HER-2 na membrana plasmática e diminuição da atividade gelatinolítica referente a MMP-9 pró-ativada. Tais mudanças fenotípicas ocorreram em função da potência utilizada, mas de forma não linear. Contudo, são marcos importantes para a compreensão de seus efeitos clínicos.

REFERÊNCIAS

AMARAL, J. G. **Efeitos de medicamentos homeopáticos no tumor de Ehrlich em camundongos: uma abordagem experimental**. 2015. 71 folhas. Tese (Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental) – Universidade Paulista, São Paulo, SP. 2015.

ANVISA. **Farmacopéia homeopática brasileira**. 3ª ed. 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf>

BALDUZZI, S. et al. Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer. **Cochrane**, v. 12, n. 6, 2014.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, p. 361-371, 2009.

BALKWILL, F. R.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. **Semin Cancer Biol**, v. 22, p. 33-40, 2012.

BANERJI, P.; CAMPBELL, D. R.; BANERJI, P. Cancer patients treated with the Banerji protocols utilising homeopathic medicine: a best case series program of the National Cancer Institute USA. **Oncol Reports**, v. 2, n. 1, p. 69-74, 2008.

BELL, I. et al. Integrative nanomedicine: treating cancer with nanoscale natural products. **Global advances in health and medicine journal**. v. 3, p. 36 – 53, 2014.

BELL, I. R. et al. Low doses of traditional nanophyto-medicines for clinical treatment: manufacturing processes and nonlinear response patterns. **J of Nanosci Nanotechnol**, v. 15, n. 6, p. 4021–4038, jun. 2015.

BELLAVITE, P. et al. Immunology and homeopathy. 1. Historical background. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, n. 4, p. 441-452, dez. 2005.

BERNHARD, E. J.; GRUBER, S. B.; MUSCHEL, R. J. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. **Proc Natl Acad Sci**, v. 91, n. 10, p. 4293-4297, 1994.

BHATTACHARYYA, S. S. et al. In vitro studies demonstrate anticancer activity of an alkaloid of the plant gelsemium sempervirens. **Sage Journals**, v. 233, n. 12, p. 1591–1601, dez. 2008.

BONAMIN, L. V. et al. Immunomodulation of homeopathic Thymulin 5CH in a BCG induced granuloma model. **Evidence-Based Complementary and Alternative medicine**, v. 2013, 15 pages, 2012.

BONAMIN, L. V.; BELLAVITE, P. Immunological models in high dilution research following M Bastide. **Homeopathy**. V. 104, n. 4, p. 263-8, 2015.

BONAMIN, L. V. (Ed). **Descobrimos como a homeopatia funciona**. Edição do autor, SBC. 70p. 2016. Disponível em: www.biodilutions.com

BONAMIN, L. V. et al. Combination of homeopathic potencies, immune response and tumor microenvironment. **In press**. 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Registros de câncer no Brasil e sua história**. SÃO PAULO, SP. 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ. 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ. 2018.

CARTWRIGHT, S. J. Solvatochromic dyes detect the presence of homeopathic potencies. **Homeopathy**, v. 105, n. 1, p. 55-65, fev. 2016.

CARTWRIGHT, S. J. Interaction of homeopathic potencies with the water soluble solvato-chromic dye bis-dimethylaminofuchson. Part 1: pH studies. **Homeopathy**, v. 106, n. 1, p. 37-46, fev. 2017.

CARTWRIGHT, S. J. Degree of response to homeopathic potencies correlates with dipole moment size in molecular detectors: implications for understanding the

fundamental nature of serially diluted and succussed solutions. **Homeopathy**, v.107, n.1, p.19-31. 2018.

CAVALCANTE, S. A. M. et al. Ações do enfermeiro no rastreamento e diagnóstico do câncer de mama no Brasil. **Rev Bras Cancerologia**, v. 59, n. 3, p. 459-466, 2013.

CHIKRAMANE, P. S. et al. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective. **Homeopathy**, v. 99, n. 4, p. 231-242, out. 2010.

CHIKRAMANE, P. S. et al. Metal nanoparticle induced hermetic activation: a novel mechanism of homeopathic medicines. **Homeopathy**, v. 106, n. 3, p. 135-144, agos. 2017.

CUPIĆ, D. F. et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 in primary and recurrent breast carcinomas. **Coll Antropol**, v. 35, n. 2, p. 7-10, 2011.

DENEZ, K. B. **Percepção dos usuários da clínica pública ou privada sobre a homeopatia e o acesso aos medicamentos homeopáticos**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Assistência Farmacêutica da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2015.

ELIA, V.; NAPOLI, E.; GERMANO, R. The “Memory of Water”: na almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions. **Homeopathy**, v.96, n. 3, p. 163-169, jul. 2007.

ELIZALDE, M. **Carcinosinum**. Instituto de homeopatia James Tyler Kent. Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://www.ihjtkent.org.br/pdf/carcinosinum-v4.pdf>

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, p. E359-E386, Lyon, France. 2014.

FONTES, O. L. **Farmácia homeopática: teoria e prática**. 2ª ed. Barueri: Manole, 2005.

FOUBISTER, D. M. Carcinosinum (1 parthy). **Acta Homeopath** Argent, Buenos Aires. p. 301-304, 1985.

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

GARRIDO, E. et al. A Interleucina-10 e seu papel nos carcinomas mamários caninos. **ARS Veterinaria**, v. 31, n. 1, p. 037-041, 2015.

GOMES, I. L.; MOREIRA, M. C. **Fisiopatologia**. Rio de Janeiro: 2007.

GUEDES, J. R.; BONAMIN, L. V.; CAPELOZZI, V. L. Water related mechanisms proposed for storing and transmitting homeopathic information: putative links with biological responses. **Homeopathy**, v.16, p. 172-180, 2018.

GUIMARÃES, F. S. F. et al. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcarea carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. **BMC Cancer**, v. 10, p. 113-126, 2010.

HADDAD, C. F. Trastuzumab no câncer de mama. **Femina**, v. 38, n. 2, p. 73-78, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v.144, p. 646–674, 2011.

HERMANN, P. C. et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 3, p. 313-323, 2007.

HOLANDINO, C. et al. Medicamentos homeopáticos e o paradigma da evidência científica. **J Manag Prim Heal Care**, v. 8, n. 2, p. 322-332, 2017.

HUA, J.; MUSCHEL, R. J. Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. **Cancer Res**, v. 56, n. 22, p. 5279-5284, 1996.

JOBIM, F. C. et al. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 6, p. 287-293, 2008.

JONAS, W. B. et al. Can homeopathic treatment slow prostate cancer growth? **Integr Cancer Ther**, v. 5, n. 4, p.343-349, 2006.

KAUR, R. P. et al. Analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine gene variants and serum cytokine levels as prognostic markers in breast cancer. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 12, p. 9716-9723, 2018.

KAWAMATA, H. et al. Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A. **Int J Cancer**, v. 63, n. 4, p. 568-575, 1995.

KLEIN, S. et al. Physicochemical investigations of homeopathic preparations: a systematic review and bibliometric analysis— Part 1. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 24, n.5, p. 409-421, 2018.

KUMAR, V. et al. **Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.61, n. 2, p. 205-209, 2010.

LEE, H. S.; HÁ, A. W.; KIM, W. K. Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells in vitro and in vivo. **Nutr Res Pract**, v. 6, n. 4, p. 294-300, 2012.

LIU, Y. et al. CD147, MMP9 expression and clinical significance of basal-like breast cancer. **Med Oncol**. v. 30, n. 1, p. 366, 2013.

LODISH, B. B. A. et al. **Molecular cell biology**. New York. 2004

MEDEIROS, N. I.; GOMES, J. A. S.; FARES, R. C. G. Detecção e quantificação da atividade enzimática das metaloproteinases e de seus inibidores por meio d técnica de zimografia. **Rev Centro Uni Newtow Paiva**. 6ª edição. 2012.

MENEZES, N. N. T.; SCHULZ, V. L.; PERES, R. S. Impacto psicológico do diagnóstico do câncer de mama: um estudo a partir dos relatos de pacientes em um grupo de apoio. **Estudos de Psicologia**, v. 17, n. 2, p. 233-240, 2012.

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

MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F. M.; YOUNG, H. A. Interleucina-10 e a resposta imune contra o câncer: um contraponto. **J Leukoc Biol**, v. 78, p. 1043-1051, 2005.

MOLASSIOTIS, A. et al. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. **Ann Oncol**, v. 16, n. 4, p. 655-663, 2005.

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

MOHAMMED, R. A. A. et al. Does loss of hormonal receptors influence the pathophysiological characteristics of the HER-2 breast cancer phenotype? **Pathophysiology**, v. 25, n. 4, p. 439-444, 2018.

NANDINI, B.; PATHIKRIT, B.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Homeopathic drugs Natrum sulphuricum and Carcinotin prevent azo dye-induced hepatocarcinogenesis in mice. **Indian J Biochem Biophys**, v. 46, n. 4, p. 307-318, 2009.

NASCIMENTO, E. S. M. **Cinética de migração de células do sistema imune após desafio com células de adenocarcinoma mamário 4t1**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. São Paulo, São Paulo. 2014.

NOGUEIRA, L. **Estudo dos efeitos de preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* na evolução de adenocarcinoma mamário em modelo murino**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. São Paulo, São Paulo. 2015.

NCCAM (National Center for Complementary and Alternative Medicine). USA: HealthInfo, 2010. Disponível em: <http://nccam.nih.gov/health/cancer/camcancer.htm>. Acesso em: 19 de agosto de 2017.

NIH (National Institutes of Health). USA: National Cancer Institute, 2010. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>. Acesso em: 19 de agosto de 2017.

OLIVEIRA, M. A. et al. Imunoexpressão da proteína Her-2 em punção aspirativa com agulha fina de carcinoma de mama: correlação com os achados da peça cirúrgica. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 25, n.1, 2003.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

OSKARSSON, T.; BATLLE, E.; MASSAGUÉ, J. Mesenchymal stem cells: sources, niches and vital pathways. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 306-321, 2014.

PARKIN, D M. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol**, v. 2, n. 9, p. 533-543, 2001.

PINHEIRO, A.; FONTES, D. H. H.; ELETÉRIO, F. A. C. **Carcinosinum X Cancerinismo**. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Cultura Homeopática – ICEH. São Paulo, 2008.

PREETHI, K. et al. Induction of apoptosis of tumor cells by some potentiated homeopathic drugs: implications on mechanism of action. **Integr Cancer Ther**, v. 11, n. 2, p. 172-182, 2012.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. A microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.

RAMONE, D. **Análise da expressão dos receptores HER-2 e sua correlação clínica em pacientes com neoplasia gástrica do setor de oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais. 2016.

REES, R. W. et al. Prevalence of complementary therapy use by women with breast cancer. A population based survey. **Eur J Cancer**, v. 36, n. 11, p. 1359-1364, 2000.

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

RENAN, R. **Da alquimia à homeopatia**. Bauru, SP: EDUSC; São Paulo: UNESP, 2002.

REY, L. Thermoluminescence of ultra high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 323, p. 67-74, 2003.

RICHARDSON, M. A. et al. Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 13, p. 2505-2514, 2000.

SATO, D. Y. O. et al. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a Brazilian homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 1, p. 26-32, 2005.

SATO, C.; LISTAR, V. G.; BONAMIN, L. V. Development of broiler chickens after treatment with thymulin 5cH: a zoo technical approach. **Homeopathy**, v.101, n.1, p.68-73, 2012.

SHI, J.; REN, Y.; ZHEN, L.; QIU, X. Exosomes from breast cancer cells stimulate proliferation and inhibit apoptosis of CD133+ cancer cells *in vitro*. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 1, p. 405-409, 2015.

SILVA, R. C. F.; HORTALE, V. Cuidados paliativos oncológicos: elementos para o debate de diretrizes nEssa área. **Cad de Saúde Públ**, v. 22, n. 10, p. 2055-2066, 2006.

SILVA, L. C. Câncer de mama e sofrimento psicológico: aspectos relacionados ao feminino. **Psicologia em estudo**, v. 13, n. 2, p. 231-237, 2008.

SORRENTINO, L. et al. Is there a role for homeopathy in breast cancer surgery? A first randomized clinical trial on treatment with Arnica montana to reduce post-operative seroma and bleeding in patients undergoing total mastectomy. **J Intercult Ethnopharmacol**, v.6, n.1, p.1-8, 2017.

SOUZA, C. M. **Carcinoma mamário murino 4t1: características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas e ensaios pré-clínicos com talidomida/carboplatina**. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2013.

SOUZA, M. **Terapias alternativas e alternativas perigosas**. 2004. Disponível em <http://www.capc.org.br/terapias.htm>. Acesso em 19 de agosto de 2017.

SUNILA, E. S. et al. Dynamized Preparations in Cell Culture. **eCAM**, v. 6, n. 2, p. 257-263, 2007.

TANG, H.; QIAO, J.; FU, Y. X. Immunotherapy and tumor microenvironment. **Cancer Letters**, v. 370, p. 85-90, 2016.

VASCONCELOS, L. D. L. et al. Expressão da metaloproteinase 9 no carcinoma de células escamosas. **Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Face**, v.13, n.4, p. 89-94, 2013.

VENÂNCIO, J. L. Importância da atuação do psicólogo no tratamento de mulheres com câncer de mama. **Rev Bras Cancerologia**, v. 50, n. 1, p. 55-63, 2004.

VIANA, C. T. R. **Caracterização do perfil inflamatório e angiogênico associados ao desenvolvimento de tumores murinos**. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2014.

XU, N. et al. Clinical study of tumor angiogenesis and perfusion imaging using multi-slice spiral computed tomography for breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 1, p. 429- 33, 2013.

ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **Int J Biol Sci**. v. 7, p. 651-658, 2011.

ZENG, Y. et al. Inverse correlation between Naa10p and MMP-9 expression and the combined prognostic value in breast cancer patients. **Med Oncol**, v. 30, n. 2, p. 562, 2013.

ZHANG, Y. et al. Elemene inhibits the migration and invasion of 4T1 murine breast cancer cells via heparanase. **Mol Med Rep**, v. 16, p. 794-800, 2017.

ZHAO, S. et al. High expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of triple-negative breast cancer (TNBC) patients. **Med Oncol**, v. 30, n. 1, p. 335, 2013.

ZHUANG-WEI, L. V. et al. Association of serum interleukin-10, interleukin-17A and transforming growth factor- α levels with human benign and malignant breast diseases. **Exp Ther Med**, v. 15, n. 6, p. 5475-5480, 2018.