

UNIVERSIDADE PAULISTA

Efeitos de altas diluições de *Phytolacca decandra* na viabilidade e expressão do fator HER-2 em adenocarcinoma mamário murino (4T1) *in vitro*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental na Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

WILLIAM ALVES DOS SANTOS

SÃO PAULO

2018

WILLIAM ALVES DOS SANTOS

Efeitos de altas diluições de *Phytolacca decandra* na viabilidade e expressão do fator HER-2 em adenocarcinoma mamário murino (4T1) *in vitro*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental na Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

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

SÃO PAULO

2018

Santos, William Alves dos.

Efeitos de altas diluições de *Phytolacca decandra* na viabilidade e expressão do fator HER-2 em adenocarcinoma mamário murino (4T1) *in vitro* / William Alves dos Santos - 2018.

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Descrição da composição dos diferentes tratamentos nas placas de cultivo	26
------------------	--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fatores de compatibilidade de crescimento tumoral	15
Figura 2:	Método Hahnemanniano na escala centesimal	18
Figura 3:	Raízes de <i>Phytolacca decandra</i>	22
Figura 4:	<i>Phytolacca decandra</i>	22
Figura 5:	Fluxograma de experimentos e testes com 4T1	27
Figura 6:	Incidência de apoptose em células 4T1 mantidas em monocultura por 24 horas, em função dos diferentes tratamentos	30
Figura 7:	Fotomicrografia de células 4T1 em esfregaço obtido da ressuspensão celular a partir da garrafa de cultura, fixado com metanol absoluto e corado pelos métodos hematoxilina-eosina, giemsa e imunocitoquímica para o antígeno de membrana HER-2. A seta indica a positividade para HER-2 em diferentes graus. As células menores hipercromáticas são células mortas.	32
Figura 8:	<i>Hallmarks of cancer</i> (adaptado de HANAHAN, WEINBERG, 2011) no tratamento de células 4T1 com diluições homeopáticas de <i>Phytolacca decandra</i> . Os resultados obtidos sugerem a interferência em pelo menos 3 pontos estratégicos (setas vermelhas): expressão de fatores de crescimento, indução de apoptose e inibição de PARP.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. – antes de Cristo

INCA – Instituto Nacional de Câncer

cH – diluição centesimal Hahnemaniana

HER-2 – human epidermal growth factor Receptor-type 2

QT – quimioterapia

ICQ – imuno-citoquímica

VE – ventrículo esquerdo

IHB – Instituto Hahnemaniano Brasileiro

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute Medium

CO₂ - dióxido de carbono

UNIP – Universidade Paulista

SUS – Sistema Único de Saúde

MS – Ministério da Saúde

EGFR- epidermal growth factor receptor

VEGF – vascular endothelial growth factor

PARP- poly ADP ribose polymerase

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

CFM – Conselho Federal de Medicina

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

RJ – Rio de Janeiro

TAC – terapias alternativas complementares

CMF – ciclofosfamida, metrotexate e 5-fluorouracil

QT – quimioterapia

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

cm – centímetro

PBHRF – Prasanta Banerji Homeopathic Research Foundation

APC-lab – Apoio em Patologia Cirúrgica Laboratorial

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

PD – *Phytolacca decandra*

G2- fase de crescimento tumoral

PARPi – inibidores da enzima poli adenosina difosfato ribose/polimerase

C-erb2 - Oncogene

AGRADECIMENTOS

A Deus por não me deixar desamparado em toda minha trajetória.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Leoni Villano Bonamin por toda sua confiança, dedicação e conselhos dados nos momentos mais preciosos, pela sua paciência e por todo seu conhecimento transmitido a mim para a realização desse trabalho.

À Prof^a Dr^a Elizabeth Hurtado pela ajuda indispensável e por compartilhar todo o conhecimento necessário para a realização desse trabalho.

À Vice-Reitoria de Pós-Graduação da UNIP pela bolsa concedida, sem a qual eu não poderia ter realizado esse trabalho.

À minha família pela compreensão, incentivo e momentos inenarráveis de ajuda e gratidão.

Às minhas amigas Thais Cristina e Sandra A. G. Gordinho pelos dias que passamos no Centro de Pesquisa da Universidade UNIP, quase que inseparáveis.

Aos meus amigos pelas palavras de ajuda e de momentos inesquecíveis que vivemos e passamos juntos, em especial Fabiana Doro e Prof^a Dr^a Natália Abou Hala Nunes, Prof^a Dr^a Roberta Kelly de Faria Souza, por todos os conselhos e ajudas inesquecíveis.

A todos os colaboradores da UNIP.

Dedico ao meu amado, companheiro, confidente, amigo, marido Bruno de Andrade Santana, pelos momentos indispensáveis que passamos juntos. Pelas suas palavras de incentivo que me fizeram acreditar cada vez mais na minha formação. Obrigado por estar comigo em todos os momentos. Te amo!

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

(Robert Collier)

RESUMO

Efeitos de altas diluições de *Phytolacca decandra* na viabilidade e expressão do fator HER-2 em adenocarcinoma mamário murino (4T1) *in vitro*

William Alves dos Santos; Leoni Villano Bonamin

Universidade Paulista – UNIP

Em estudo anterior, experimental, *in vivo*, observou-se que o tratamento de camundongos inoculados com células 4T1 com *Phytolacca decandra* em diferentes diluições homeopáticas apresentavam mudanças no crescimento tumoral e na expressão de HER-2. HER-2 (receptor de fator de crescimento epidermal, com atividade tirosina-quinase) é super-expressa em cerca de 30% dos carcinomas ductais invasivos humanos e, por isso, é alvo de tratamentos específicos. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra*, preparadas segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira, na apoptose, morfologia e expressão de HER-2 em células 4T1 *in vitro*. Células 4T1 tratadas no momento do cultivo foram analisadas após 24 horas quanto à positividade para anexina V pelo método Countess® para a avaliação da apoptose. A expressão de HER-2 foi avaliada pelo método da imuno-citoquímica e a morfologia das células foi avaliada pelas colorações hematoxilina-eosina e Giemsa, a partir de esfregaços obtidos das células em suspensão. Células tratadas com *Phytolacca decandra* 200cH mostraram aumento no número de células positivas à anexina V (células em apoptose) e ocorrência de células bi ou multinucleadas. A expressão de HER-2 na superfície celular foi irregular nessas células, bem como nas células tratadas com a diluição 12cH, sugerindo infraregulação desse receptor. Em suma, os resultados mostram alterações fenotípicas significativas em células 4T1 tratadas com *Phytolacca decandra* 200cH, as quais merecem estudos mais aprofundados.

Palavras-Chave: câncer de mama, HER-2, células 4T1, homeopatia.

ABSTRACT

Effects of high dilutions of *Phytolacca decandra* on viability and expression of HER-2 factor in murine mammary adenocarcinoma (4T1) *in vitro*

William Alves dos Santos; Leoni Villano Bonamin

Universidade Paulista – UNIP

In a previous study, experimental, the treatment of mice inoculated with 4T1 cells with *Phytolacca decandra* at different homeopathic dilutions produced changes in tumor growth and expression of HER-2. HER-2 protein (epidermal growth factor receptor, with tyrosine kinase activity) is superexpressed in about 30% of human invasive ductal carcinomas and, therefore, is targeted by specific treatments. The objective of this study was to evaluate the effect of different homeopathic dilutions of *Phytolacca decandra*, according to the Brazilian Homeopathic Pharmacopeia, on apoptosis, morphology and expression of HER-2 in 4T1 cells *in vitro*. Treated 4T1 cells were analyzed after 24 hours of culture, for positivity to annexin V, using the Countess® method, for apoptosis evaluation. HER-2 expression was assessed by the immuno-cytochemistry method and cell morphology was evaluated by hematoxylin-eosin and Giemsa staining, in smears obtained from suspended cells. Cells treated with *Phytolacca decandra* 200cH showed increase in the number of annexin V positive cells (apoptosis cells) and occurrence of bi or multinucleated cells. HER-2 expression on the membrane was irregular in these cells, as well as in those treated with the 12cH dilution, suggesting downregulation of the receptor. In short, the results show significant phenotypic changes in 4T1 cells treated with *Phytolacca decandra* 200cH, which deserve further studies.

Key words: breast cancer, HER-2, 4T1 cells, homeopathy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Etiologia do câncer.....	14
1.2 Câncer de mama.....	15
1.2.1 Epidemiologia do câncer de mama.....	15
1.2.2 Terapêutica para câncer de mama uso de anticorpo monoclonal anti-HER-2	17
1.3 Histórico da homeopatia.....	18
1.4 Terapias complementares e alternativas.....	19
1.5 Programa Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS - PNPIC.....	20
1.6 O medicamento <i>Phytolacca decandra</i>	21
1.7 Estudos sobre preparações homeopáticas de <i>Phytolacca decandra</i> em oncologia experimental	23
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. METODOLOGIA.....	25
3.1 Tipo de Estudo	25
3.2 Preparação dos medicamentos.....	25
3.3 Cultura de células 4T1 e métodos de análise celular	27
3.3.1 Cultivo de células e análise da viabilidade celular	27
3.3.2 Imuno-citoquímica (ICQ).....	28
3.3.3 Coloração por hematoxilina – eosina e giemsa	29
3.4 Ética	29
3.5 Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30

4.1	Apoptose	30
4.2	Morfologia	30
5.	DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÃO.....	38
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia do câncer

O câncer é uma das principais enfermidades que acometem a população mundial e uma das mais relevantes doenças, em se tratando de morbimortalidade, em todo o mundo. Ocorre por erros no processo de divisão celular, levando à invasão de tecidos adjacentes (HANAHAAN *et al.* 2011). Um dos mais antigos tumores identificados no ser humano foi em um maxilar com sinais de linfoma, datado de 4.000 a.C. Contudo, não há um primeiro registro científico inaugural que fale sobre a doença, conhecida desde as antigas civilizações (RENAN, 2002).

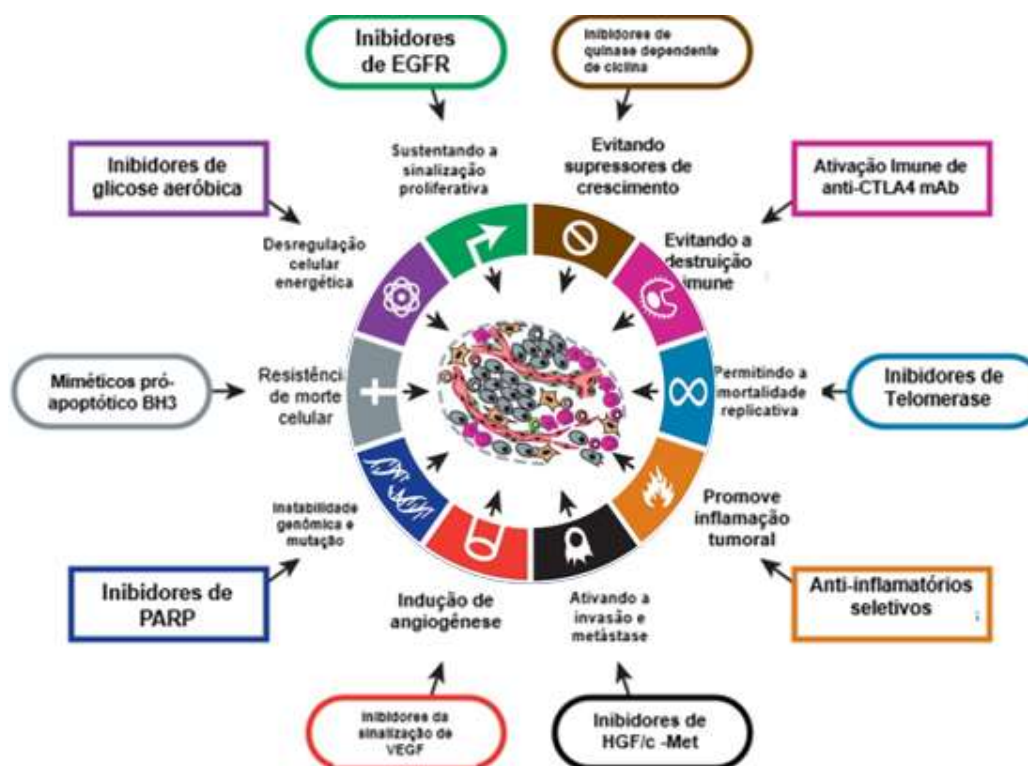
A etiologia do câncer é multifatorial, podendo ter origem na combinação de vários fatores extrínsecos e intrínsecos – genéticos, ambientais e de hábitos de vida – e fatores comportamentais e culturais, como tabagismo, inatividade física, alimentação inadequada, excesso de peso, consumo excessivo de álcool, exposição a radiações ionizantes e a agentes infecciosos específicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

Na etiologia do câncer, os fatores genéticos e componentes ambientais têm papel determinante na oncogênese, ou seja, os tumores são compreendidos como resultado de agressões ambientais em um indivíduo geneticamente suscetível (FILHO, 1994). Assim, o câncer é o produto final desse processo complexo, que se desenvolve em múltiplos estágios, sendo que em cada um deles ocorrem alterações genéticas e epigenéticas. Dessa forma, o câncer pode ser considerado uma doença genômica de células somáticas (FILHO, 1994).

As principais alterações genéticas que ocorrem nas neoplasias envolvem os “dez marcos do câncer e suas compatibilidades” (HANAHAAN, WEINBERG, 2011), que são: manutenção de sinalizações proliferativas ininterruptas, com alteração do gene EGFR (*epidermal growth factor receptor*) e da proteína HER-2, consequentemente; evasão dos fatores supressores de crescimento, com a

inibição das enzimas *ciclina-dependentes de quinase*; escape à destruição celular pela resposta imunológica; imortalidade replicativa com a inibição da telomerase; promoção da inflamação tumoral; ativação de mecanismos de invasão de metástase; indução da angiogênese pela sinalização do VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*); promoção de mutação e instabilidade genômica; indução de resistência à morte celular por meio da regulação de fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos e, finalmente, alterações da energia celular, com a inibição da glicose aeróbica (HANAHAAN, WEINBERG, 2011). De acordo com a imagem abaixo (**Figura 1**).

Figura 1. Fatores de compatibilidade do crescimento tumoral.



Fonte: Adaptado de HANAHAAN & WEINBERG, *Hallmarks of cancer*, 2011

1.2 Câncer de mama

1.2.1 Epidemiologia do câncer de mama

Desde o século passado, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) realiza pesquisas por estimativas e publica anualmente as incidências de câncer no território brasileiro, gerando informações sobre os seus tipos específicos e agregando dados entre estados e capitais brasileiras. Essas informações são oficialmente divulgadas por meio de publicações anuais, realizadas para gestores de saúde, serviços em saúde, universidades, centros de pesquisas, sociedades científicas e entidades não governamentais, além de serem inseridas na própria página virtual do instituto. Assim, este serviço informa populações sobre o panorama do câncer no país e gera planejamento para novos estudos científicos (INCA, 2006).

O Câncer de mama é o mais comum entre os cânceres que acometem as mulheres, que representa uma das principais causas de letalidade nesse público feminino, pois tanto o tratamento e o prognóstico desse tumor dependem exclusivamente do seu tamanho, números de linfonodos acometidos e de metástases (CALDAS, APARICIO, 2002). Em 2006, a estimativa era de 237.480 novos casos de câncer para o sexo feminino, onde o mais frequente entre os tumores ginecológicos eram os de mama (49 mil casos) e de colo uterino (19 mil casos)

A distribuição das taxas de incidência de câncer de mama no Brasil de acordo com os dados coletados pelo INCA mostra que Belo Horizonte apresentou a maior incidência de câncer de mama e Belém a menor (RABELO, 2004). O câncer de mama é a segunda causa de mortalidade em mulheres mundialmente e o primeiro em causa de morte na Índia (PATNAIK *et al.*, 2011; DEVI *et al.*, 2015), no Brasil estima-se que ocorrerão 59.700 novos casos de câncer de mama no período de 2018 e 2019, em um risco estimado de 56,33 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

O carcinoma de mama humano é a neoplasia maligna com incidência mundial crescente entre as mulheres (PARKIN, 2001; INCA, 2018). Entre os países do mundo, a Holanda apresenta a maior incidência (90,2/100.000), seguida pelos Estados Unidos, com taxa de 86,9/100.000. Dados de 2018 mostram que haverá em torno de 268,670 novos casos com 41,400 mortes entre as mulheres estadunidenses e, no Brasil, até o fim do ano 2018 estima-se que 59.700 mulheres serão diagnosticadas com câncer de mama (EINSENBERG, 2004; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018, INCA, 2018).

1.2.2 Terapêutica para câncer de mama uso de anticorpo monoclonal anti-HER-2

O HER-2 (receptor de EGF com atividade tirosina-quinase) é encontrada super expressa em cerca de 30% dos carcinomas ductais invasivos. Esta proteína está relativamente associada à amplificação gênica em tumores mamários de comportamento biológico agressivo, sobretudo naqueles indivíduos que possuem linfonodo positivo (BANKFALVI, 2000; SCHNITT, 2001).

Tumores que super expressam HER-2 respondem menos à ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil (CMF) e tamoxifeno e são mais responsivos às antraciclinas, quando comparados aos tumores que não apresentam super expressão da proteína HER-2. Portanto, a detecção desta proteína permite que o anticorpo monoclonal Trastuzumabe, em associação à quimioterapia (QT), diminua a progressão tumoral do carcinoma mamário invasivo, desde que positivo para esse marcador (MILES, 2001; PICCART *et al.*, 2000; VIEIRA *et al.*, 2007).

A imuno-histoquímica (IHQ) é o teste de rotina para a avaliação da expressão de HER-2, devido à facilidade da técnica e à significância biológica (SALES *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2007). O Ministério da Saúde (MS), em agosto de 2017, publicou a portaria nº29, a fim de incorporar, também no Sistema Único de Saúde (SUS), o Trastuzumabe no tratamento do câncer de mama HER-2 positivo metastático. Com a incorporação deste medicamento no SUS, estima-se que 300 pacientes sejam beneficiadas, no Brasil, a cada ano (DEBIASI, BARRIOS, 2015; KALIKS *et al.*, 2017).

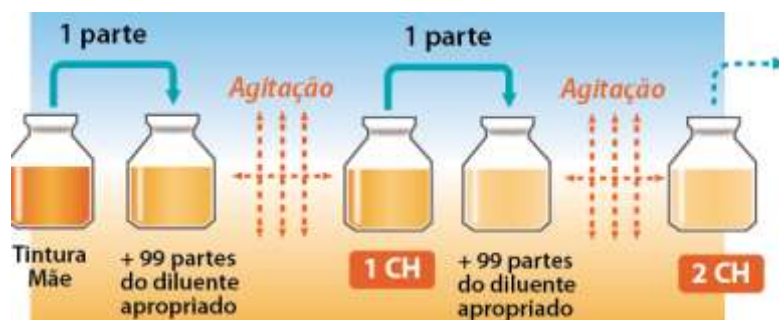
Segundo SANCHES E SILVA (2010), a administração de Trastuzumabe isoladamente, sequencial ou em combinação com a quimioterapia pode acarretar em lesão cardíaca reversível, com redução da força contrátil do ventrículo esquerdo (VE). A insuficiência cardíaca sintomática foi observada em 2,5% a 5,1% de casos tratados, com falência do miocárdio e óbito de 0% a 4,1%, dependendo de fatores intercorrentes como hipertensão arterial sistêmica (HAS) e o tipo de quimioterapia (QT) utilizada (NUNES *et al.*, 2007). Assim sendo, fatores que possibilitam o uso otimizado do Trastuzumabe são

recursos potenciais para melhorar a eficiência deste medicamento e reduzir efeitos tóxicos. Esse é um dos focos do presente estudo.

1.3 Histórico da homeopatia

Samuel Hahnemann (1755-1843), médico germânico fundador da homeopatia, ainda continua a ser a principal referência para médicos homeopatas. Hahnemann observava a doença pelos fatores desencadeantes e pela sintomatologia que o enfermo apresentava, mais especificamente, pela aplicação do princípio da “similitude sintomática”. As medicações eram diluídas de forma seriada e dinamizadas (agitadas em movimentos verticais), até ultrapassar o número de Avogadro (**Figura 2**). Por esse motivo, o tema ainda hoje é polêmico (RENAN, 2002). O princípio “semelhante cura semelhante” é compreendido como a relação entre os sintomas manifestados por um indivíduo e os sintomas que são provocados por uma ou mais substâncias, conforme os aspectos toxicológicos e patogênicos (BONAMIN, 2008).

Figura 2. Método Hahnemanniano na Escala Centesimal



Fonte: homeopatiaunb, 2011

A partir dos anos 80, a homeopatia passou a assumir um aspecto cada vez mais científico e menos doutrinário. Surgem em todo o mundo sociedades científicas interessadas no tema, institutos de pesquisa com apoio público e privado e grupos de pesquisa de ponta, focados na compreensão dos mecanismos de ação. Índia, Brasil e Itália são hoje os países líderes na pesquisa em homeopatia no mundo (BONAMIN, 2016).

Em 1980 a Homeopatia se transformou em uma especialidade médica reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) e, desde 1997, é reconhecida como uma especialidade veterinária pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Em 2015 a Homeopatia passou a ser reconhecida também como uma especialidade na odontologia e farmácia (BONAMIN, 2016).

Os medicamentos homeopáticos são utilizados para diversas manifestações clínicas, entre elas as neoplasias (ADLER *et al.*, 1996; ULLMAN, 2003; PEREIRA *et al.*, 2005; PILKINGTON *et al.*, 2005; SUNILA *et al.*, 2007; KASSAB *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2013). Contudo pacientes tratados pelo protocolo Banerji utilizando a homeopatia, no Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos, mostrou melhora nos sinais e sintomas e nos exames complementares, com impacto no prognóstico, como a redução de tumor esofágico observada por exame radiográfico (BANERJI P, CAMPBELL DR, BANERJI P, 2008).

1.4 Terapias complementares e alternativas

Terapias alternativas e complementares, como exemplo: fitoterapia, homeopatia, crenoterapia, cromoterapia e acupuntura, têm sido definidas como terapias baseadas no conhecimento, habilidades e práticas derivadas tanto de teorias filosóficas como de experiências utilizadas. Pacientes com histórico de câncer utilizam com grande frequência terapias alternativas e complementares, sendo adotadas por até 40% dos usuários (SHNEERSON *et al.*, 2013).

Na Europa, a homeopatia é a terapia complementar mais praticada, sendo usada em 12 a 24% dos casos (SHNEERSON *et al.*, 2013; GAERTNER *et al.*, 2014). Estudos comparativos em pacientes com câncer utilizando terapia convencional e alternativa demonstraram que a homeopatia aumenta a sobrevida, melhora a qualidade de vida e diminui os efeitos colaterais quando utilizada concomitantemente com o tratamento tradicional (GAERTNER *et al.*, 2014, FRASS *et al.*, 2015). Por exemplo, o uso de *Arnica montana* 1000x em pacientes recém mastectomizadas reduz a formação de seromas pós operatórios (SORRENTINO *et al.*, 2017); os medicamentos *Ruta graveolens* 5cH e *Rhus toxicodendron* 9cH reduzem dores articulares decorrentes de

efeitos colaterais oriundos do tratamento de mulheres com agentes inibidores de aromatases (KARP *et al.*, 2016) e *Psorinum* 6x deflagra os sinais de apoptose em células de carcinoma de pulmão (A546) *in vitro* (MONDAL *et al.*, 2016). Dentre os estudos que abordam possíveis associações entre homeopatia e tratamento convencional, destaca-se o trabalho de GLEISS *et al.*, 2016, em que um aumento de sobrevida de até 12 meses foi observado em pacientes oncológicos que optaram pela associação. Estudos experimentais mostram que a *Thuja occidentalis*, o *Carcinosinum* e a *Ruta graveolens* apresentam efeitos anti-neoplásicos por suas propriedades imunomoduladoras (REMYA; KUTTAN, 2015).

Os mecanismos de ação das medicações homeopáticas têm sido estudados amplamente por diversos laboratórios nos últimos anos. Do ponto de vista celular, estudos experimentais com medicamentos altamente diluídos demonstraram efeitos moduladores em diversas funções celulares e sistêmicas, incluindo a resposta imune (SATO *et al.*, 2012; BONAMIN *et al.*, 2012; BONAMIN; BELLAVITE, 2015). Do ponto de vista biofísico, duas hipóteses são discutidas atualmente: a hipótese da nanofarmacologia, considerada desde a descoberta da existência dessas partículas nas preparações homeopáticas, em 2010, e a hipótese da ressonância elétrica, baseada na teoria dos “domínios de coerência da água”, proposta nos anos 80 por Emilio Del Giudice e corroborada experimentalmente por vários estudos experimentais (BELL *et al.*, 2014; CARTWRIGHT, 2016, 2017, 2018; GUEDES *et al.*, 2018; KLEIN *et al.*, 2018).

1.5 Programa Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS - PNPIC

A homeopatia no Brasil foi introduzida pelo médico Benoit Mure em 1840 e a primeira faculdade de homeopatia foi instalada no Rio de Janeiro (RJ), hoje transformada no Instituto Hahnemanniano Brasileiro (IHB). A criação do Sistema Único de Saúde (SUS), em 1980, mostrou-se ressonante aos princípios da homeopatia, abrindo espaço para o tratamento de pacientes utilizando esta terapêutica (NECKEL, CARMIGNAN, CREPALDI, 2009).

Em 2006, após três anos de debates com a sociedade civil organizada, ocorre a aprovação da PNPIC pelo Conselho Nacional de Saúde, através da portaria 971, de 3 de maio de 2006 que passa assegurar aos usuários do SUS o uso de práticas médicas tradicionais, tais como medicina chinesa, acupuntura, homeopatia, fitoterapias, entre outras. Em dezembro de 2007, foi publicada a portaria de 3.237 do Ministério de Saúde (MS), que inclui os medicamentos homeopáticos (aproximadamente 450 medicamentos), em conformidade com as recomendações do PNPIC (NECKEL, CARMIGNAN, CREPALDI, 2009).

1.6 O medicamento *Phytolacca decandra*

Também chamada de *Phytolacca americana*, *pokeweed*, *uva-de-rato*, *erva-tintureira* e *caruru-de-cacho* (GHOSH *et al.*, 2013, NOGUEIRA, 2015) é um medicamento tradicional homeopático cuja planta usada como matéria prima é encontrada na Europa, sul da França e América do Norte (RAVIKIRAN, VENUGOPAL, 2011). É uma planta herbácea que pode alcançar até 2 metros de altura, com raízes napiformes (**Figura 3**) e galhos eretos. Suas folhas são de cor verde claro, com pecíolos curtos, elípticos-ovais, pontiagudas, de bordos lisos e ondulados. É constituído de um cacho com flores pequenas de 5 sépalas, braço-rósea ou branco-esverdeado. Os frutos são de cerca de 1 cm de diâmetro e quando maduros, possui cor púrpura escura bem definidos (ANVISA, 2011).

As raízes são inodoras e possuem sabor terroso de início, depois adocicado e passando a amargo no fim. A sua preparação é por meio de maceração ou percolação, de forma que o teor alcóolico durante e ao fim da preparação seja de 60% (V/V) segundo a técnica geral de preparação da tintura mãe, provida de raízes da planta, conforme descrito na Farmacopéia Homeopática Brasileira. Sua essência é um líquido claro, amarelo pálido, com sabor picante e levemente amargo (ANVISA, 2011) (**Figura 4**).

A *Phytolacca decandra* tem como sintomas patogenéticos “seios endurecidos, dores nos seios, mastites, seios edemaciados e endurecidos, tumores de mama, bicos rachados e dolorosos”. *Phytolacca decandra* preparada homeopaticamente é um valioso agente local no tratamento de

quase todas as formas de tumores, assim como o tratamento para reumatismo, conjuntivite regular, psoríase e doenças de pele (CAIRO, 1984; GHOSH et al.2013, NOGUEIRA, 2016).

Figura 3. raízes de *Phytolacca decandra*.



Fonte:https://www.innerpath.com.au/matmed/herbs/Phytolacca_american.htm, 2014

Figura 4. *Phytolacca decandra*



Fonte:https://www.innerpath.com.au/matmed/herbs/Phytolacca_american.htm, 2014

1.7 Estudos sobre preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* em oncologia experimental

Estudos sobre *fitoterápicos* (medicamentos obtidos exclusivos de vegetais), colaboram para que avancemos na pesquisa para o desenvolvimento de novas terapias e recursos adjacentes orientados ao tratamento do câncer, interferindo na sua diferenciação celular (SUFFREDINI *et al.*, 2007). Mais especificamente, sabe-se que saponinas isoladas de *Phytolacca decandra* mostram atividade citotóxica contra o câncer de mama e de cólon (DAS *et al.*, 2012). Em paralelo ao uso da *Phytolacca decandra* como agente fitoterápico complementar no tratamento do câncer de mama, seu uso como medicamento diluído e dinamizado – em preparações homeopáticas – também é considerado (PICKUP *et al.*, 2014; NOGUEIRA, 2015; FRENKEL *et al.*, 2010; BISWAS *et al.*, 2005; BHATTACHARJEE *et al.*, 2009; KHUDA-BUKHSH, 2012; BIGAGLI *et al.*, 2014).

Recentemente, NOGUEIRA (2015) demonstrou que o tratamento de camundongos com *Phytolacca decandra* 30cH produz redução significativa do crescimento tumoral quando inoculados com células 4T1 na mama, com metástase pulmonar. Por outro lado, o tratamento com *Phytolacca decandra* 12cH implicou na maior expressão de HER-2, observada por imunohistoquímica. Células da linhagem 4T1 são uma derivação do adenocarcinoma mamário (PULASK, OSTRAND-ROENBERG, 2000) isolado de uma população de camundongos BALB/c que deu origem ao tumor primário (DUPRE *et al.*, 2007). Essas células são metastáticas e invasivas, podendo evoluir para metástase em linfonodos, fígado, pulmões, ossos e cérebro; o que é muito semelhante ao comportamento natural do tipo de câncer de mama em seres humanos (PULASK, OSTRAND-ROENBERG, 2000; DUPRE *et al.*, 2007). Por esse motivo, é um excelente modelo de estudo na área de oncologia experimental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da medicação homeopática *Phytolacca decandra* em diluições, 5cH, 12cH, 30cH e 200cH na viabilidade, apoptose e morfologia de células 4T1, para a expressão de HER-2, *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de HER-2 por imuno-citoquímica, em função do tratamento *in vitro*.
- Avaliar a morfologia de células 4T1 *in vitro* após o uso da medicação *Phytolacca decandra* em diferentes diluições homeopáticas;
- Avaliar a porcentagem de células apoptóticas, em função do tratamento, por meio do método Countess® associado à marcação das células com anti-anexina V.

3. METODOLOGIA

3.1 Tipo de Estudo

Estudo de caráter descritivo, prospectivo, randomizado, duplo-cego, de caráter experimental com análise intervencionista entre os grupos de pesquisa, com avaliação entre os grupos de controle e os de intervenção.

3.2 Preparação dos medicamentos

As matrizes de *Phytolacca decandra* nas potências 4cH, 11cH, 29cH e 199cH foram preparadas em farmácia homeopática credenciada na ANVISA e dispensadas em álcool 30%. As amostras de trabalho de *Phytolacca decandra* nas potências 5cH, 12cH, 30 cH e 200cH foram preparadas em água pura estéril (obtida por osmose reversa), filtrada em filtro Millipore com malha de 0.22 micrômetros, a partir de matrizes 4cH, 11cH, 29cH e 199cH (Laboratório Schraiber do Brasil, lotes: 2669124, 2669125, 2669126 e 2669127, respectivamente, todos com validade para fevereiro de 2019). As potências finais foram preparadas no próprio laboratório de experimentação, utilizando braço mecânico Denise® (AUTIC, BRASIL), de acordo com o procedimento estabelecido na Farmacopeia Homeopática Brasileira, 3ª Edição (ANVISA, 2011), usando a escala centesimal Hahnemaniana (cH).

A manufatura da últimas potências usando água estéril permitiu a redução da concentração de álcool em 100 vezes. Multiplicando-se pelo fator de diluição (1:5) dos medicamentos no meio de cultura celular, tem-se uma concentração final de 0.06% de álcool, o que permitiu evitar possíveis efeitos citotóxicos inespecíficos do veículo sobre as células, durante o experimento.

Os controles foram feitos com o veículo (água pura estéril), com (1cH) ou sem sucussão, no mesmo aparelho, seguindo os mesmos passos descritos para os medicamentos. Todos os procedimentos de preparo e estocagem e toda manipulação dos medicamentos foram feitos em fluxo laminar.

Antes de iniciar o estudo, os frascos dos medicamentos e do veículo dinamizado tiveram suas etiquetas substituídas por códigos por um funcionário do laboratório não envolvido diretamente na experimentação. As etiquetas originais e os respectivos códigos foram mantidos em envelope lacrado durante todo o ensaio e o mesmo só foi aberto após o término da análise estatística. Dessa forma, todo o estudo foi conduzido em cego.

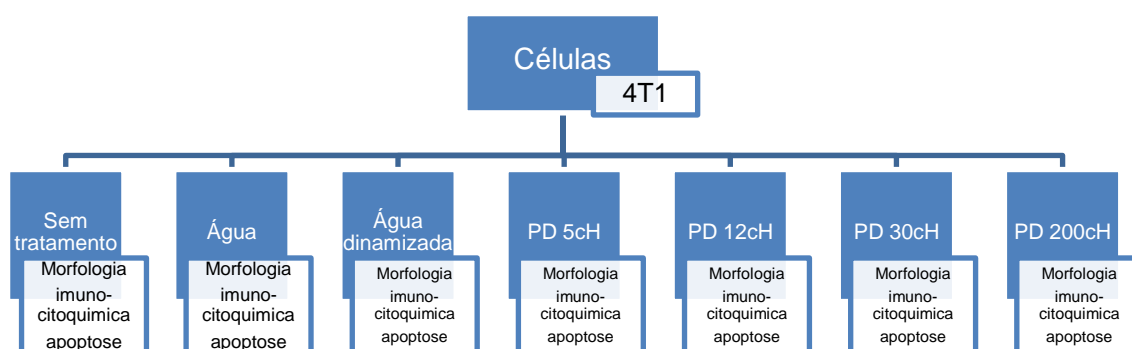
Foram utilizados sete grupos de tratamento, em que cada garrafa de cultura contendo 1×10^5 células (contadas em câmara de Neubauer utilizando o método do azul de Tripam para identificar as células viáveis) suspensas em 5 mL de meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) – chamado de meio R10 – recebeu 500 μ L do respectivo tratamento. Os efeitos foram avaliados após 24 horas. Os grupos de tratamento estão resumidos no **Quadro 1**:

Quadro 1: Descrição dos diferentes tratamentos aplicados nas placas de cultivo.

1	Cultura 4T1 – 1×10^5 sem tratamento
2	Cultura 4T1 – 1×10^5 + Veículo (água)
3	Cultura 4T1 – 1×10^5 + Phytolacca 5cH
4	Cultura 4T1 – 1×10^5 + Phytolacca 12cH
5	Cultura 4T1 – 1×10^5 + Phytolacca 30cH
6	Cultura 4T1 – 1×10^5 Phytolacca 200 cH
7	Cultura 4T1 – 1×10^5 + água dinamizada

O delineamento experimental foi desenhado de forma que todas as análises, em quadruplicata, fossem provenientes de uma mesma população celular, igualmente tratadas. Assim, as alíquotas utilizadas para a elaboração da contagem de células positivas para marcadores de apoptose e os respectivos esfregaços foram retirados da mesma garrafa. 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 (**Figura 5**).

Figura 5. Fluxograma de experimentação e testes com células 4T1



3.3 Cultura de células 4T1 e métodos de análise celular

3.3.1 Cultivo de células e análise da viabilidade celular

As células 4T1 foram obtidas do Departamento de Imunologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Em seguida, foram distribuídas em garrafas de cultura e incubadas em meio R10 a 37°C, com 5% CO₂, por 20 minutos, sempre em fluxo laminar, para expansão e posterior alíquotagem e congelamento.

Após descongelamento, as células foram ressuspensas em meio R10, contadas em câmara de Neubauer utilizando o método do Azul de Tripán e semeadas para aderir à superfície da garrafa pequena, na quantidade de 1×10^5 células por garrafa, contendo 5mL de meio RPMI 1640 (GIBCO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (meio R10). As células não aderentes foram removidas por lavagem com RPMI 1640. As células aderidas foram tratadas com os medicamentos ou os veículos, todos estéreis, em um volume correspondendo a 10% do volume total de meio. Os efeitos do tratamento sobre as células foram avaliados após 24 horas de incubação em estufa de CO₂. Após esse período, foi retirado o sobrenadante das 7 garrafas, aliquotando-o em amostras de 1,0 mL em 5 microtubos, para serem estudados posteriormente quanto à presença de citocinas. As células foram removidas com 1,0 mL tripsina diluída em meio RPMI e lavadas em PBS (tampão fosfato salina) gelado, com auxílio de *cell scraper*.

Em seguida, a contagem de células em apoptose foi feita pelo sistema Countess® (LifeTechnologies, Eugene, Oregon, USA), usando o kit Alexa Fluor® 488 – Annexin V apoptosis (LifeTechnologies, Eugene, Oregon, USA), seguindo instruções do fabricante. Esse kit utiliza anticorpos anti-anexina ligados ao fluorocromo para marcação direta das células positivas, por fluorescência. O contador celular Countess® é um microscópio de fluorescência automático, que permite a identificação e contagem imediata das células fluorescentes, dispostas em câmaras de contagem próprias do equipamento.

Parte das células em suspensão foi utilizada para a confecção de esfregaços, em quintuplicata, sendo as células fixadas com metanol, por 15 minutos e, após secas, guardadas em freezer até a sua utilização.

3.3.2 Imuno-citoquímica (ICQ)

As lâminas previamente fixadas foram encaminhadas para o *Laboratório de Apoio em Patologia Cirúrgica* (APC-LAB) para que a marcação para HER-2 fosse feita e analisada no Centro de Pesquisa da Universidade Paulista (UNIP). Após teste piloto para determinação de origem e diluição ideais, escolheu-se a diluição de 1:200 do anticorpo policlonal DAKO (lote 20027851B) como padrão.

Após a imunomarcação, utilizando anticorpo secundário ligado à peroxidase e DAB (diaminobenzidina) para revelação, as células positivas foram fotografadas a partir de 8 a 10 campos microscópicos aleatórios, em fotomicroscópio acoplado a câmera digital (NIKON E200, Japan), para que fossem feitas as análises descritivas da morfologia e da intensidade de marcação.

3.3.3 Coloração por hematoxilina – eosina e giemsa

Parte das lâminas fixadas foram coradas no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisa da UNIP pelos métodos hematoxilina-eosina e Giemsa, para análise minuciosa da morfologia em fotomicroscópio acoplado a câmera digital (NIKON E200, Japan).

3.4 Ética

Por ser um estudo *in vitro* utilizando linhagens celulares de adenocarcinoma mamário murino (4T1), não envolvendo animais em pesquisa, esse trabalho não teve a obrigatoriedade da aprovação pela CEUA da Universidade Paulista (UNIP).

3.5 Análise estatística

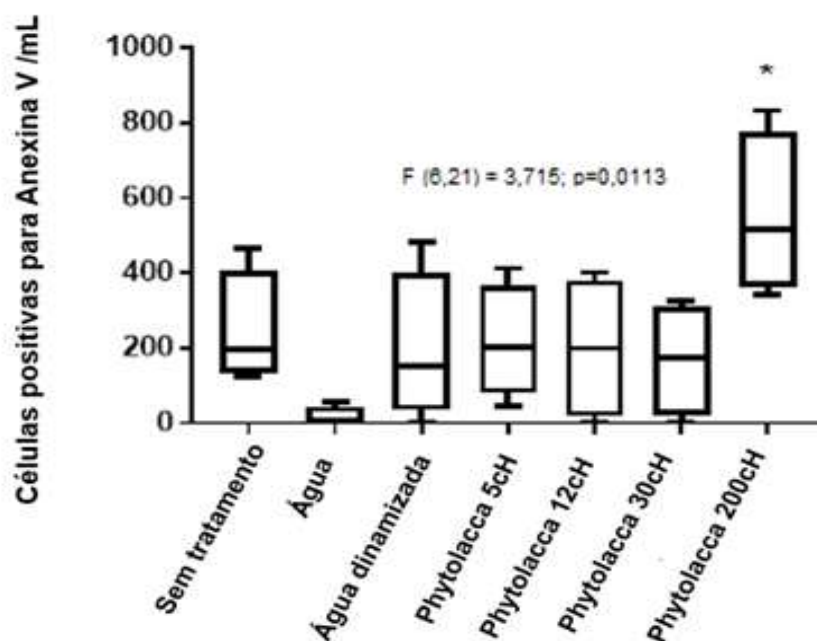
A homoscedasticidade das amostras foi determinada pelo teste de Bartlett, pelo software INSTAT 3.0. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida de Tukey, sendo $p \leq 0,05$. Não houve necessidade de remoção de “outliers”. Os gráficos e as análises foram gerados pelo software Prism 7.0.

4. RESULTADOS

4.1 Apoptose

A incidência de células 4T1 em apoptose identificada pelo método da anexina V mostrou aumento estatisticamente significativo na população celular [$F(6,21) = 3,715$; $p=0,0113$] tratada com *Phytolacca decandra* 200cH, em relação ao controle (água) (**Figura 6**).

Figura 6: Incidência de apoptose em células 4T1 mantidas em monocultura por 24 horas, em função dos diferentes tratamentos. ANOVA de uma via, seguida de Tukey, em relação ao controle (água).



4.2 Morfologia


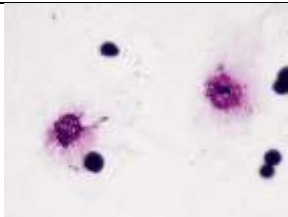
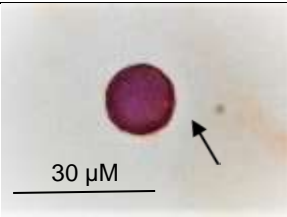

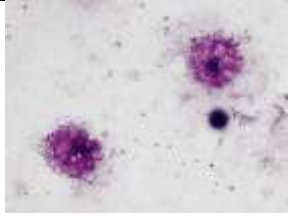







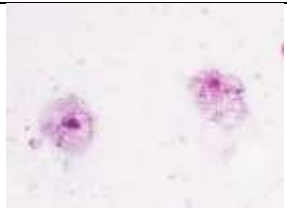
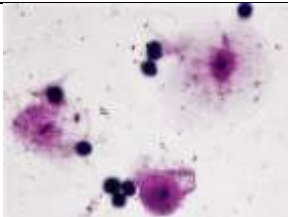
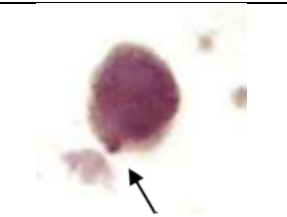
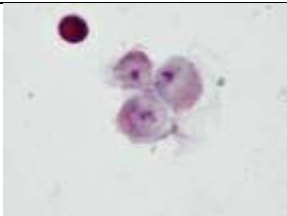


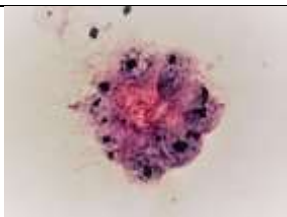


Os achados morfológicos obtidos por citologia a partir dos esfregaços feitos das células em cultura ressuspendidas das garrafas estão representados na **Figura 7**.

Nota-se que todas as células representadas pelas colorações hematoxilina-eosina (HE) e Giemsa apresentam formato arredondado com

graus variados de espraçamento citoplasmático quando aderidas à lâmina. Os núcleos celulares são ovoides ou arredondados, medindo em torno de 15 µm e apresentam nucléolo evidente ou duplo, independente do tratamento. Apenas células que receberam o tratamento com *Phytolacca decandra* 200cH apresentaram células com dois ou mais núcleos. Na **Figura 7**, observa-se uma célula multinucleada neste grupo. Células mortas apresentam tamanho reduzido e hipercromasia, provavelmente decorrente da manipulação das células.

A marcação para HER-2 por imunocitoquímica, por sua vez, mostrou diferentes padrões de expressão desta proteína na membrana. As células que não receberam tratamento ou que foram tratadas com água apenas mostraram distribuição uniforme de marcação de membrana. Células tratadas com água dinamizada (submetida a 100 sucussões), por sua vez, mostraram intenso padrão de expressão de HER-2 na membrana, com certa irregularidade na sua distribuição. Células tratadas com *Phytolacca decandra* 5cH e 30cH mostraram menor expressão de HER-2 na membrana, tendendo à negatividade. Células tratadas com *Phytolacca decandra* 12cH e 200cH mostraram distribuição irregular de marcação para HER-2 na membrana, com formação de “clusters”, talvez associada a processo de endocitose, a confirmar. A irregularidade dos contornos celulares das células tratadas com *Phytolacca decandra* 200cH pode indicar processo apoptótico. Todas as imagens estão mostradas na **Figura 7**.

Figura 7: Fotomicrografia de células 4T1 em esfregaço obtido da ressuspensão celular a partir da garrafa de cultura, fixado com metanol absoluto e corado pelos métodos hematoxilina-eosina, Giemsa e imunocitoquímica para o antígeno de membrana HER-2. A seta indica a positividade para HER-2 em diferentes graus. As células menores hipercromáticas são células mortas.

Tratamento	Hematoxilina-eosina	Giemsa	Imunocitoquímica para HER-2
Sem tratar			
Água			
Água dinamizada			
Phyt 5cH			
Phyt 12cH			
Phyt 30cH			
Phyt 200cH			

5. DISCUSSÃO

Na homeopatia são utilizados altas diluições de plantas, minerais ou até mesmo de animais, seguidas de sucussões (agitações verticais repetidas) (KHUDA-BUKHSH, 2006; MUKHERJEE A; BOUJEDAINI N; KHUDA-BUKHSH, 2013). Uma pesquisa realizada em Kolkata, Índia, mostrou que 21.888 pacientes portadores de tumores malignos foram submetidos a tratamento homeopático com protocolos padronizados por um período de 15 anos, tendo-se observado melhora clínica em 19% dos casos, casuística semelhante àquela obtida por tratamento convencional no mesmo período (BANERJI *et al.*, 2008). Tal casuística tem grande relevância no contexto daquele país, onde parte muito reduzida da população tem acesso aos recursos da medicina moderna convencional.

Os resultados obtidos nesse modelo experimental *in vitro* demonstraram que o tratamento de células 4T1 com diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* implicou em mudanças diversas de seus padrões fenotípicos, tais como: maior ocorrência de apoptose, alterações qualitativas nos padrões de expressão de HER-2 na membrana e ocorrência de células multinucleadas, em especial no tratamento com a diluição 200cH.

Em estudo anterior realizado com camundongos (NOGUEIRA, 2015), evidenciou-se que animais tratados com *Phytolacca decandra* 12cH e 200cH apresentaram redução de hemorragia e congestão pulmonar e o grupo 12cH, em especial, mostrou aumento no número de células positivas para HER-2. É importante observar, contudo, que os efeitos observados *in vivo* são resultado de ações do medicamento tanto sobre as células 4T1 quanto no micro-ambiente tumoral e os achados são resultantes de modificações em uma rede de componentes, locais e sistêmicos, o que não se observa *in vitro*.

Ao contrário, houve aumento de células positivas para marcadores de apoptose apenas quando tratadas com *Phytolacca decandra* 200cH *in vitro*. Assim sendo, o significado biológico da ação de cada diluição homeopática específica depende do contexto em que os elementos estão inseridos. Mesmo assim, o estudo *in vitro* é importante para se demonstrar os efeitos do medicamento diretamente sobre as células tumorais, mesmo sem a intervenção da resposta imune local. Assim, as caspases que participam da

sinalização celular que levam a célula à morte são as principais efetoras do processo de apoptose nesse grupo tratado com potência de 200cH (MARTI *et al.*, 2000, ZUCCARI *et al.*, 2008). A indução de apoptose diretamente nas células 4T1 corresponde a um dos pontos estratégicos para o tratamento do câncer (*Hallmarks of cancer*), segundo HANAHAN, WEINBERG, 2011 (**Figura 8**).

Por outro lado, a identificação de receptores específicos também pode ser uma estratégia importante, tanto para diagnóstico, quanto para o desenvolvimento de novos recursos terapêuticos. Por exemplo, receptores de estrogênio e de progesterona são receptores hormonais e são peças-chave para o desenvolvimento da glândula mamária, assim como também para a gênese de tumores mamários (DEKKER *et al.*, 2015). A expressão do receptor HER-2, por sua vez, indica uma amplificação para o gene HER-2; com a super-expressão desses receptores na membrana do tumor, ou seja, quanto mais receptores de HER-2 tiver na membrana citoplasmática, mais o tumor se replicará com anormalidades, pois se trata de receptores para fatores de crescimento (MOHAMMED *et al.*, 2018).

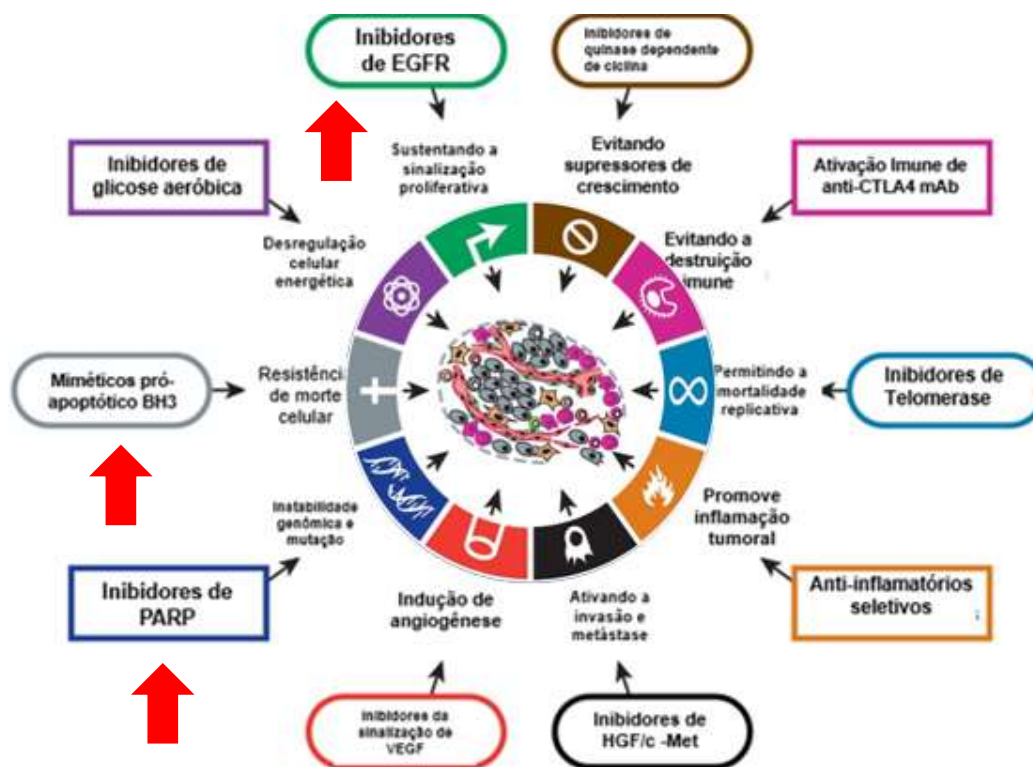
Na prática clínica, a identificação de células imuno-positivas para HER-2 é critério fundamental para a escolha da terapêutica a ser adotada, uma vez que anticorpos monoclonais anti-HER-2 podem ser utilizados nesses casos, embora haja sempre grande risco de toxicidade (PERNAS *et al.*, 2018). Por esse motivo, o desenvolvimento de terapias complementares capazes de otimizar o uso de tais medicamentos pode contribuir para a redução dos efeitos colaterais, tanto de curto como de longo prazo, além de reduzir o custo do tratamento. Nesse caso, os dados obtidos na imuno-citoquímica para pesquisa de expressão de HER-2 pelas células 4T1 do presente trabalho, mostram que o uso da *Phytolacca decandra* em preparações homeopáticas poderia modificar o padrão de expressão desse receptor em função da diluição, mas de maneira não linear. Esse dado é corroborado pelos estudos realizados anteriormente, *in vivo* (NOGUEIRA, 2015), embora apenas o número de células positivas tenha sido averiguado nesse estudo, sem a observação de padrões fenotípicos de expressão desta proteína na membrana.

Tais padrões, conforme observado neste estudo, mostram certa irregularidade na expressão desse marcador na membrana de células 4T1

após o tratamento com as diluições 12cH e 200cH, sugerindo a possibilidade de *downregulation* desse receptor, o que aponta a necessidade de estudos específicos para essa questão no futuro. Se essa hipótese for confirmada, há que se considerar possíveis interferências na terapêutica com anticorpos monoclonais, nos casos de uso concomitante com preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra*. Por outro lado, a possível endocitose dos receptores implicaria em redução no ritmo de crescimento tumoral, o que potencializaria os tratamentos convencionais não dependentes de HER-2. Trata-se, portanto, de uma segunda estratégia para a abordagem do câncer, conforme HANAHAN, WEINBERG, 2011 (**Figura 8**). Outro aspecto importante é o aumento da positividade observado nas células tratadas com água dinamizada (submetida à agitação), mas, neste caso, a expressão foi uniforme por toda a superfície da membrana. Trata-se, provavelmente, de mecanismo diverso das primeiras.

A ocorrência de células multinucleadas após tratamento com *Phytolacca decandra* 200cH é um achado sugestivo de modificações na expressão de PARP [poli (ADP-ribose) polimerase]. A PARP é uma proteína nuclear zinco-dependente que se liga ao DNA e a outras proteínas intra-nucleares para controlar o ciclo celular, sobretudo na deflagração da duplicação do DNA na fase G2 do ciclo celular (REIN *et al.*, 2015). A utilização terapêutica de inibidores de PARP prolonga a fase G2, gera mitoses aberrantes e células multinucleadas, bem como induz a célula à morte por apoptose (REIN *et al.*, 2015). Segundo JUNG *et al.* (2015), princípios ativos (neolignanos) isolados de *Phytolacca americana* induzem o arraste da fase G2 do ciclo celular em linhagem de câncer de cólon humano *in vitro*. Embora não se saiba em que medida a ação da *Phytolacca decandra* 200cH (em preparações homeopáticas) sobre as células 4T1 poderia interferir nessa via de sinalização, a observação de células multinucleadas é um importante sinalizador para novas pesquisas com esse enfoque. Caso se confirme, esse seria um terceiro ponto dos *Hallmarks of cancer* a ser modificado pela *Phytolacca decandra*. As hipóteses sobre essas possíveis ações estão resumidas na **Figura 8**.

Figura 8. *Hallmarks of cancer* (adaptado de HANAHAN, WEINBERG, 2011) no tratamento de células 4T1 com diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra*. Os resultados obtidos sugerem a interferência em pelo menos três pontos estratégicos (setas vermelhas): expressão de fatores de crescimento, indução de apoptose e inibição de poli ADP ribose polimerase.



Dados da literatura mostram que várias espécies de *Phytolaccaceae* têm efeito anti-proliferativo quando usadas como agentes fitoterápicos, em função de seu vasto repertório de princípios ativos (MANESS *et al.*, 2014; SALERI *et al.*, 2017), como por exemplo os triterpenóides (DAS *et al.*, 2014) e o ácido oleanólico (GHOSH *et al.*, 2014), mas há poucos artigos mostrando seus efeitos anti-tumorais em preparações homeopáticas, sobretudo em diluições acima do número de Avogadro. Em ARORA *et al.*, (2013), observou-se indução de apoptose de células COLO-205 após tratamento das células em cultura com tintura-mãe de *Phytolacca decandra* e também com diluições que variaram entre 30c, 200c, 1M e 10M. GHOSH *et al.* (2013) mostrou que a tintura-mãe de *Phytolacca decandra* foi capaz de induzir apoptose de células A375 concomitante com a produção de espécies reativas de oxigênio. Observou-se

infra-regulação das proteínas Akt e Bcl-2 e suprarregulação de Bax, p53 e Caspase 3.

Os resultados obtidos nesse estudo, portanto, corroboram os dados da literatura e adicionam aspectos relacionados às variações fenotípicas das células 4T1 tratadas com preparações homeopáticas altamente diluídas de *Phytolacca decandra*.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento de células 4T1 *in vitro* com diferentes diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* produz aumento do número de células positivas para anexina V (células em apoptose), multinucleação e expressão irregular de HER-2 na membrana plasmática sugestiva de *downregulation* desse receptor. Tais efeitos foram mais evidentes nas células tratadas com a diluição 200cH, corroborando dados da literatura. A pesquisa sobre as vias de sinalização envolvidas na regulação desses marcadores indica a necessidade de estudos futuros.

REFERÊNCIAS

ADLER Ubiratan. *et al.* A strict definition of homeopathy according to Hahnemann. **British Homeopathic Journal**, v. 85, p. 79-82, 1996.

ANVISA. 2011. **Farmacopéia Homeopática Brasileira**, 3a. Ed. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf

ARORA Shagun, AGGARWAL Ayushi, SINGLA Priyanka, JYOTI Saras, TANDON Simran. Anti-proliferative effects of homeopathic medicines on human kidney, colon and breast cancer cells. **Homeopathy**, v.102, n.4, p.274-82, 2013.

BANERJI Prasanta; CAMPBELL Donald R; BANERJI Pratip. Cancer patients treated with the Banerji protocols utilising homeopathic medicine: a best case series program of the National Cancer Institute USA. **Oncology Reports**. v.20, n.1, p. 69-74, 2008

BANKFALVI Agnes. *et al.* Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. **Histopathology**, v. 37, n. 5, p. 411-9, 2000

BELL Iris, SARTER Barbara, KOITHAN Mary, BANERJI Prasanta, JAIN Shamini, IVES John. Integrative Nanomedicine: Treating cancer with nanoscale natural products. **Global advances in health and medicine journal**. v. 3, p. 36 – 53, 2014.

BHATTACHARJEE Nandini, PATHAK Surajit, KHUDA-BAKSH Anisur Rahman. Amelioration of carcinogen-induced toxicity in mice by administration of a potentized homeopathic drug, Natrum sulphuricum 200. **Evidence-Based Complementary and Alternative medicine**, v.6, p. 65 – 75; 2009.

BIGAGLI Elisabetta, LUCERI Cristina, BERNARDINI Simonetta, DEI Andrea, FILIPPINI Angelica, DOLARA Piero. Exploring the effects of homeopathic Apis mellifica preparations on human gene expression profiles. **Homeopathy**, v. 103, p. 127 – 132; 2014.

BISWAS Suriyo Jyoti, PATHAK Surajit, BHATTACHARJEE Nandini, KUMAR Jayanta, KHUDA-BAKSH Anisur Rahman. Efficacy of the potentized homeopathic drug, Carcinosin 200, fed alone and in combination with another drug, Chelidonium 200, in amelioration of p-dimethylaminobenzene-induced hepatocarcinogenesis in mice. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 11, p. 839 – 854, 2005.

BONAMIN Leoni Villano; BELLAVITE Paolo. Immunological models in high dilution research following M Bastide. **Homeopathy**. v.104, n.4, p.263-8, 2015.

BONAMIN Leoni Villano (Ed). **Signals and Images. Contributions And Contradictions about Hight Dilution Research**. Springer, Dordrecht .1a. ed. v.1. p. 3-22, 2008.

BONAMIN Leoni Villano (Ed). **Descobrimos como a homeopatia funciona**. Edição do autor, SBC. 70pp. 2016. Disponível em: www.biodilutions.com. Acesso em: 10 de setembro de 2018.

BONAMIN Leoni Villano, SATO César, ZALLA NETO Ruggero, MORANTE Graziela, CARDOSO Thayná Neves, SANTANA Fabiana R, COELHO Cideli de Paula, OSUGUI Lika, POPI Ana Flávia, HURTADO Elizabeth Cristina Perez, MARIANO Mario. Immunomodulation of Homeopathic Thymulin 5CH in a BCG-Induced Granuloma Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative medicine**, v. 2013, 15 pages, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde**. 2006. Rio de Janeiro.p11-112

BREAST [Internet]. **American Cancer Society, Cancer Statistics Center**; 2018 Acesso em: 12 de Fevereiro de 2018. Disponível em: <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#!/cancer-site/Breast>

CALDAS Carlos, APARICIO Samuel. A. J., Cancer: **The molecular outlook**. Nature, v. 415, p. 484 – 485, 2002.

CAIRO Nilo. **Guia de Medicina Homeopática**. Editora Teixeira, São Paulo. 21a. edição, p. 515-516, 1984.

CARTWRIGHT Steven John. 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.

CARTWRIGHT Steven John. Interaction of homeopathic potencies with the water soluble solvatochromic dye bis-dimethylaminofuchson. Part 1: pH studies. **Homeopathy**, v.106. n.1, p.37-46, 2017.

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

DAS Jayeeta., DAS Sreemanti, SAMADDER Asmita., BHADRA, K., KHUDA-BUKHSH Anisur Rhaman. Poly (lactide-co-glycolide) encapsulated extract of *Phytolacca decandra* demonstrate better intervention against induced lung adenocarcinoma in mice and on A549 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 313 – 324, 2012.

DAS Jayeeta, DAS Sreemanti, PAUL Avijit, SAMADDER Asmita, KHUDA-BUKHSH Anisur Rhaman. Strong anticancer potential of nano-triterpenoid from

Phytolacca decandra against A549 adenocarcinoma via a Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptotic pathway. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v.7 n.3, p.40-50, 2014.

DEBIASI Márcio, REINERT Tomás, KALIKS Rafael, et al. Estimation of premature deaths from lack of Access to anti-HER2 therapy for advanced Breast Cancer in the Brazilian Public Health System. **Journal of Global Oncology**. Disponível em: [Http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JGO.2016.005678](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JGO.2016.005678). Acesso em 26 de outubro de 2018.

DEBIASI Márcio B; BERRIOS Carlos Henrique. Estimated number of breast câncer deaths in the Brazilian Public Health System due to lack of Access to adjuvant trastuzumab between 2005 and 2012. **Journal of Global Oncology**. Disponível em: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e17601. Acesso em 26 de outubro de 2018.

DEKKER T.J., BORG S., HOOIJER G.K., MEIJER S.L., WESSELING J., BOERS J.E., et al. Quality assessment of estrogen receptor and progesterone receptor testing in breast cancer using a tissue microarray-based approach, **Breast Cancer Research and Treatment**, v.152 , p.247–252, 2015

DEVI B. *et al.* Awareness and prevalence of risk factors of breast câncer and cervix cancer among women more than 35 years of age residing in low income colony. **International Journal of Oncology**. v1 p. 1-10, 2015.

DUPRE Sally A.; REDELMAN Doug; HUNTER Júnior Kenneth W. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumor foci. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88. p. 351 – 360, 2007.

EISENBERG Ana Lúcia Amaral. **Sobrevida de cinco anos para pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama sem comprometimento de linfonodos axilares**. Coorte Hospitalar, 1992-1996. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2004.

FERRAZ, Fabiana Nabarro; SIMONI Geysa Karla; NASCIMENTO Anélio; MELO Carolina Sundin; ALEIXO Denise Lessa; GOMES Mônica Lúcia; SPACK Miguel; DE ARAÚJO, Silvana Marques. Different forms of administration of biotherapy 7 DH in mice experimentally infected by Trypanosomacruzi produce different effects. **Homeopathy**, v. 100 n.4, p. 237-243, 2011.

FILHO Geraldo Brasileiro. *et al.* **Bogliolo**: Patologia – 5ª edição, Rio de Janeiro – Guanabara Koogan, 1994

FRASS Michael, FRIEHS Helmut, THALLINGER Christiane, SOHAL Narinderjit Kaur, MAROSI Christiane, MUCHITSCH Lise, GAERTNER Katharina, GLEISS Andreas, SCHUSTER Ernst, OBERBAUM Menachem. Influence of adjunctive

classical homeopathy on global health status and subjective wellbeing in cancer patients – A pragmatic randomized controlled trial, **Complementary Therapies in Medicine**, v.23. p. 309 – 317, 2015

FRENKEL Moshe Bar, MISHRA Mukund, SEN Subrata., YANG Peiying, PAWLUS Alison, VENCE Luis, LEBLANC Aimee, COHEN Lorenzo, BANERJI Pratip, BANERJI Prasanta. Cytotoxic effects of ultradiluted remedies on breast cancer cells, **International Journal of Oncology**, v. 36, p. 395-403, 2010.

GAERTNER Katharina, MÜLLNER Michael, FRIEHS Helmut, SCHSTER Ernst, MAROSI Christine, MUCHITSCH Ilse, FRASS Michael, KAYE Alan David. Additive homeopathy in cancer patients: Retrospective survival data from a homeopathic outpatient unit at the Medical University of Vienna. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 22. p. 320 – 332, 2014.

GHOSH Samrat. *et al.* "Homeopathic mother tincture of *Phytolacca decandra* induces apoptosis in skin melanoma cells by activating caspase-mediated signaling via reactive oxygen species elevation, **Journal of Integrative Medicine**, v. 11, p. 116 - 124, 2013.

GHOSH Samrat, BISHAYEE Kausik, KHUDA-BUKHSH Anisur Rhaman. Oleanolic acid isolated from ethanolic extract of *Phytolacca decandra* induces apoptosis in A375 skin melanoma cells: drug-DNA interaction and signaling cascade. **Journal of Integrative Medicine**, v.12 n. 2, p.102-114, 2014.

GLEISS Andreas, FRASS Michael, GAERTNER Katharina. Re-analysis of survival data of cancer patients utilizing additive homeopathy. **Complementary Therapies and Medicine**, v. 27, p.65-7, 2016.

GUEDES José Roberto, BONAMIN Leoni Villano, CAPELOZZI VL. Water-Related Mechanisms Proposed for Storing and Transmitting Homeopathic Information: Putative Links with Biological Responses. **Homeopathy** v.16, p. 172-180, 2018.

HANAHAN, D; WEINBERG R.A. Hallmarks of Cancer: The next generation. **Cell** 144, p. 646-674, 2011

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA/MS) PRÓ-ONCO. **Câncer de mama**. Disponível: <http://www.inca.org.br/etast/tipos/mama.html>. (capturado em 10 de Agosto de 2018).

JUNG Cholomi, HONG Ji-Young, BAE Song Yi, KANG Sam Sik, PARK Hyen Joo, LEE Sang Kook. Antitumor Activity of Americanin A Isolated from the Seeds of *Phytolacca americana* by Regulating the ATM/ATR Signaling Pathway and the Skp2-p27 Axis in Human Colon Cancer Cells. **Journal of Natural Products**, v.78(12), p.2983-93, 2015.

KARP Jean Claude, SANCHEZ Carole, GUILBERT Phillipe, MINA William, DEMONCEAUX Antoine, CURÉ Hervé. Treatment with *Rutagraveolens* 5CH and *Rhustoxicodendron* 9CH may reduce joint pain and stiffness linked to

aromatase inhibitors in women with early breast cancer: results of a pilot observational study. **Homeopathy**, v.105, n.4, p.299-308, 2016.

KASSAB Sosie, CUMMINGS Mike, BERKOVITZ Saul, VAN HASELEN Robbert, FISHER Peter. Homeopathic medicines for adverse effects of cancer treatments. **Cochrane Database System**, v. 2, p. 1465 - 1858, 2009.

KHUDA-BUKHSR Anisur Rhaman. Laboratory research in homeopathy: pro. **Integrative Cancer Therapy**. v. 5, n. 4, p.320-32, 2006.

KHUDA-BUKHSR Anisur Rhaman. Search for a molecular mechanism of action of the potentized homeopathic drugs in living organisms. **International Journal of High Dilution Research**, v. 11, p. 147, 2012.

KLEIN Sabine, WURTENBERGER Sandra, WOLF Ursula, BAUMGARTNER Stephan, TOURNIER Alexander, 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.

MANESS Lisa, GOKTEPE Ipek, CHEN H, AHMEDNA Mohamed, SANG Shengmin. Impact of *Phytolacca americana* extracts on gene expression of colon cancer cells. **Phytotherapy Research**, v. 28, n.2, p.219-23, 2014.

MARTI Andreas, GRABER Hans, LAZAR Hedvika, RITTER Philip M, BALTZER Anna, SRINIVASAN Anu, *et al.* Caspases: decoders of apoptotic signals during mammary involution. Caspase activation during involution. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 480, p. 195 -201; 2000.

MILES, David. W. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. **Breast Cancer Research**, v. 3, n. 6, p. 380-4, 2001

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO – CONTAPP. “Falando de Câncer e seus fatores de risco”. Rio de Janeiro, 1996

MOHAMMED Rabab Ahmed Ahmed, et al., Does loss of hormonal receptors influence the pathophysiological characteristics of the HER-2 breast cancer phenotype? **Pathophysiology**, 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/.acesso> em 10 de Agosto de 2018

MONDAL Jesmin, SAMADDER Asmita, KHUDA-BUKHSR Anisur Rhaman. Psorinum 6 x triggers apoptosis signals in human lung cancer cells. **Journal of Integrative Medicine**, v.14, n.2, p.143-53, 2016.

MUKHERJEE Avinaba; BOUJEDAINI Naoual; KHUDA-BUKHSR, Anisur Rhaman. Homeopathic Thuja 30C ameliorates benzo(a)pyrene- induced DNA damage, stress and viability of perfusedlung cells of mice in vitro. **Journal of Integrative Medicine**, v.11, n.6, p.397-404, 2013.

NECKEL, G.L., CARMIGNAN, F., CREPALDI, M.A. A homeopatia no SUS na perspectiva de estudantes da área da saúde. **Revista Brasileira de Educação em Medicina**, v. 34, n. 1. P82-90, 2010.

NOGUEIRA, Luciana. **Estudo dos efeitos de preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* na evolução de adenocarcinoma mamário em modelo murino**. Dissertação de mestrado em Patologia Ambiental e Experimental. UNIP, São Paulo. 2016.

NUNES, Cristiana B., ROCHA Rafael Malagoli, GOUVÊA, Agostinho Pinto, TAFURI, Luciene S.A., MARINHO Vanessa Fortes Zschaber, REZENDE, Marina Alvarenga, GOBBI Helenice. Concordância interobservador na interpretação imuno-histoquímica da superexpressão do HER-2 detectada por cinco diferentes anticorpos em *array* de carcinomas mamários. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n 1. P373-9, 2007.

PARKIN, D.M. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet 5. Oncology**, v.2, n.9, p. 533-43, 2001.

PATNAIK Jennifer L., BYERS Tim, DIGUISEPPI Carolyn, DABELEA Dana, DENBERG, Thomas D. Cardiovascular disease competes with breast câncer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast câncer. **Breast Cancer Research**, v 1. p 1-9; 2011.

PEREIRA, W. K.; LONARDONI, Maria. V.; GRESPAN, R.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R. K.; BERSANI-ARMADO, C. A. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of Infectology**, v. 51. p. 157-164, 2005.

PERNAS Sonia, BARROSO-SOUSA Romualdo, TOLANEY Sara M. Optimal treatment of early stage HER2-positive breast cancer. **Cancer**. 2018. [Epub ahead of print] Review.

PICCART, M. J.; DI LEO A.; HAMILTON, A. HER2: A “predictive factor” ready to use in the daily management of breast cancer patients. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 14, p. 1755-61, 2000.

PILKINGTON Karen, KIRKWOOD Graham, RAMPES Hagen. Homeopathy for depression: a systemic review of the research evidence. **Homeopathy**, v. 94, p. 153-163, 2005.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**. Supplement 39, Chapter 20-2, 2000

RAVIKIRAN, G., RAJU, A.B., VENUGOPAL, Y. *Phytolacca americana*: A Review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**. v. 2, p. 942 – 946; 2011.

REBELO, M. **Análise sobre classe social e fatores assistenciais como prognósticos para sobrevida de pacientes com câncer de mama feminina, residentes no município do Rio de Janeiro, atendidas no Instituto Nacional de Câncer.** Tese de doutorado em Clínica Médica. UFRJ, Rio de Janeiro. 2004.

REIN Idun Dale, LANSSVERK Kirsti Solberg, MICCI Francesca, PATZKE Sebastian, STOKKE Trond. Replication-induced DNA damage after PARP inhibition causes G2 delay, and cell line-dependent apoptosis, necrosis and multinucleation. **Cell Cycle**, v. 14, n.20, p.3248-3260, 2015.

REMYA Valsalakumari, KUTTAN Girija. Homeopathic remedies with antineoplastic properties have immunomodulatory effects in experimental animals. **Homeopathy**. v.104, n.3 p.211-9, 2015

RUIZ, Renan. **Da alquimia à homeopatia.** Bauru, SP: EDUSC – UNESP, São Paulo, 2002. 99pp.

SALERI Flora Didii, CHEN Guilin, LI Xun, GUO Mingquan. Comparative Analysis of Saponins from Different Phytolaccaceae Species and Their Antiproliferative Activities. **Molecules**, v. 22, n.7, p1077, 2017.

SALES Alexandre de Oliveira, RODRIGUES Sarah Jane de Paiva, BACCHI Carlos E. Estudo comparativo entre os métodos LSAB®+ e Herceptest® para a detecção de HER-2/neu em carcinoma de mama. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 4, p. 265-71, 2004.

SANCHES Solange Moraes, SILVA Jairo Montemor Augusto. Interação entre especialidades: miocardiopatia dilatada e neoplasia de mama HER2 positiva. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v.94 n 1. P11-15, 2010

SATO, D. Y. O., OLIVEIRA, C. C., CATTANEO, R. I. I., MALVEZZI, M., GABARDO, J. BUCHI, F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, p. 26 -32, 2005.

SATO Cesar, LISTAR Veranice Galha, BONAMIN Leoni Villano. Development of broiler chickens after treatment with thymulin 5cH: a zoo technical approach. **Homeopathy**, v.101, n.1, p.68-73, 2012.

SCHNITT, Stuart. J. Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges. **Modern Pathology**, v. 14, n. 3, p. 213-8, 2001.

SIQUEIRA Camila Monteiro, COSTA Beatriz, AMORIM Ana Maria, GONÇALVES Marta, VEIGA Venicio Féo, CASTELO-BRANCO Morgana, TAKYIA Christina, ZANCAN Patricia, CÂMARA Fernando Portela, COUCEIRO José Nelson, HOLANDINO Carla. H3N2 homeopathic influenza virus solution modifies cellular and biochemical aspects of MDCK and J774G8 cell lines. **Homeopathy**, v. 102. p. 31-40, 2013.

SHNEERSON Catherine, TASKILA Taina, GALE Nicola, GREENFIELD Sheila, CHEN Yen-Fu. The effect of complementary and alternative medicine on the quality of life of cancer survivors: A systematic review and meta-analyses. **Complementary Therapies in Medicine**. v. 21. p. 417-429; 2013.

SORRENTINO Luca, PIRANEO Salvatore, RIGGIO Eliana, BASILIC Silvia, SARTANI Alessandra, BOSSI Daniela, CORSI Fabio. 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. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v.3;6, n.1, p.1-8, 2017.

SUFREDDINI Ivana Barbosa, PACIENCIA, Mateus L.B., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N. *In vitro* breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v. 62, p.798-800, 2007.

SUNILA Ellanzhiyil Surendran, KUTTAN Ramadasan, PREETHI Korengath Chandran, KUTTAN Girija. Dynamized Preparations in Cell Culture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6. p. 257-263, 2009

ULLMAN Dana. Controlled Clinical Trials evaluating the homeopathic treatment of people with human immunodeficiency virus or acquired immunodeficiency syndrome. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, p. 133-141, 2003.

VIEIRA Daniella Serafin Couto, DUFLOTH Rozany Mucha, SCHMITT Fernando Carlos Lander, ZEFERINO Luiz Carlos. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v30, n1, p. 42-7, 2008.

ZALLA NETO Ruggero, RUSSO R. Toledo, MORANTE Graziela, DOS ANJOS, B., MARIANO Mario. BONAMIN Leoni Villano. Evolution of granulomatous Inflammation in the Subcutaneous tissue under treatment with thymulin in Homeopathic preparations: a Pilot Study. **International Journal of High Dilution Research**. v. 5, p.1; 2006.

ZUCCARI Debora A. P. C, BERTON Carla R.; TERZIAN Ana Carolina B, RUIZ, Camila M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arquivos de Ciências da Saúde**. v. 15, p. 189-98, 2008.