

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DE PREPARAÇÕES  
HOMEOPÁTICAS DE *Phytolacca decandra* NA  
EVOLUÇÃO DE ADENOCARCINOMA  
MAMARIO EM MODELO MURINO**

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

**LUCIANA NOGUEIRA**

**SÃO PAULO  
2016**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DE PREPARAÇÕES  
HOMEOPÁTICAS DE *Phytolacca decandra* NA  
EVOLUÇÃO DE ADENOCARCINOMA  
MAMARIO EM MODELO MURINO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado

**LUCIANA NOGUEIRA**

**SÃO PAULO  
2016**

Nogueira, Luciana.

Estudo dos efeitos de preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* na evolução de adenocarcinoma mamário em modelo murinho / Luciana Nogueira. - 2016.

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

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Biologia da diferenciação e transformação celular: modulação por fatores endógenos e exógenos.

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

Coorientador: Prof. Dr. Leoni Villano Bonamin.

1. Homeopatia. 2. *Phytolacca decandra*. 3. Células de adenocarcinoma mamário 4T1. 4. Modelos animais. I. Perez, Elizabeth Cristina (orientadora). II. Bonamin, Leoni Villano (coorientadora). III. Título.

**LUCIANA NOGUEIRA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DE PREPARAÇÕES  
HOMEOPÁTICAS DE *Phytolacca decandra* NA  
EVOLUÇÃO DE ADENOCARCINOMA  
MAMARIO EM MODELO MURINO**

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

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/

Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/

Profa. Dra. Silvia Regina Kleeb  
Universidade Metodista – UMESP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/

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

*Aos meus pais, Ana e Valdevir, que batalharam a vida toda para que eu pudesse chegar onde estou e continuam ainda sendo o alicerce da minha vida. Ao meu esposo Evandro, que me apoia incondicionalmente, ao meu filho Isaac que se uniu a nós nesse momento e nos fez mais felizes e a Deus que me permitiu mais essa experiência neste mundo de tanto aprendizado, todo meu agradecimento e meu amor...*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado, pela dedicação nas correções e orientações neste período de aprendizado.

À Prof.<sup>a</sup> Leoni Villano Bonamin, por sua boa vontade e apoio contínuo, sua postura sempre calma e acessível, que foi sempre um alívio em momentos de tensão.

À minha equipe de trabalho, que tornou meu desafio de lidar com o tempo restrito ter uma tarefa possível de realizar com sua ajuda e apoio constante.

À equipe de Patologia Ambiental e Experimental da Unip, sem os quais este caminho teria sido mais difícil.

Ao Prof. Eduardo Bondan, pelo incentivo fundamental para iniciar essa nova etapa em minha vida, mesmo após tantos anos fora do ambiente acadêmico.

À APC-Lab, Apoio em Patologia Cirúrgica, pelo ótimo serviço e suporte com as análises imunohistoquímicas.

Aos amigos da A Herborista, Farmácia de Manipulação que gentilmente doaram as matérias primas para preparação dos medicamentos homeopáticos.

Aos meus colegas de pós-graduação que tornaram um período de longa dedicação em algo divertido, foram ombros, ouvidos e sorrisos nos momentos mais difíceis.

Meu sincero agradecimento, com toda vibração de amor e consideração por todos.

*“O Farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe  
unguentos úteis à saúde e seu trabalho não  
terminará.”*  
(Eclesiástico - 38:7).

## RESUMO

### ESTUDO DOS EFEITOS DE PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DE *Phytolacca decandra* NA EVOLUÇÃO DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO EM MODELO MURINO

Homeopatia é uma terapia eficiente e segura que contribui na melhora da qualidade de vida e atenua os efeitos adversos da terapia convencional utilizada em diferentes doenças. Entretanto até o momento, são poucos os estudos publicados mostrando os efeitos das preparações homeopáticas no desenvolvimento de tumores. Segundo a literatura homeopática clássica, a *Phytolacca decandra* é considerada como uma boa opção no tratamento de tumores mamários. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* no desenvolvimento do adenocarcinoma mamário em modelo murino. Para isto, células de adenocarcinoma mamário 4T1 foram inoculadas de forma subcutânea próximas à mama inguinal esquerda em camundongos fêmeas BALB/c. Em seguida, os animais foram tratados com água contendo *Phytolacca decandra* nas potências 6, 12, 30, 200CH ou com somente o veículo dinamizado (controle), em cego por 21 dias. O crescimento do tumor foi monitorado em dias alternados durante esse período e após eutanásia, o tumor, baço e pulmões foram removidos durante a necropsia para estudos histológicos e imunohistoquímicos. Resultados demonstraram que animais tratados com 30CH apresentaram retardamento no crescimento e peso do tumor, menor vascularização e valores menores em relação ao peso relativo do baço, presença de metástase e hemorragia pulmonar quando comparados aos outros grupos. O tratamento com 12CH embora apresente resultados semelhantes à potência 30CH, não apresentou redução significante no crescimento tumoral. Em contraste, nas análises de imunohistoquímica, o grupo tratado com 12CH teve marcação mais intensa de p53 mutante em áreas de necrose, menor expressão de caspase-3 e maior expressão de c-erbB-2. O grupo tratado com 6CH apresentou maior vascularização e expressão de p53 mutante em células tumorais e alta expressão de caspase-3. O grupo tratado com 30CH, que nas análises iniciais demonstrou os resultados mais interessantes, não apresentou diferenças nas análises imunohistoquímicas, além de apresentar menor área de marcação de p53 em áreas de necrose. Em conjunto, este estudo piloto demonstra que o tratamento com potência 30CH induz retardamento do crescimento do tumor de mama sugerindo que esta potência pode ser uma alternativa terapêutica promissora no tratamento do câncer de mama. Em contraste a potência 12CH poderia ser utilizada de forma combinada com terapias convencionais a fim de potencializar e otimizar os efeitos destes tratamentos.

**Palavras-chave:** Homeopatia, *Phytolacca decandra*, células de adenocarcinoma mamário 4T1, câncer de mama, oncologia experimental.

Apoio financeiro: Capes-Prosup

## ABSTRACT

### STUDY OF HOMEOPATHIC PHYTOLACCA DECANDRA PREPARATIONS IN EVOLUTION OF BREAST ADENOCARCINOMA IN MURINE MODEL

Homeopathy is an effective and safe therapy that contributes to improving quality of life and reduces adverse effects of conventional therapy against many diseases. However, there are few published studies showing effects of homeopathic medicines in tumors development. According to classical homeopathy literature, *Phytolacca decandra* is considered a good option in breast tumors treatment. The aim of this study was evaluate the effects of homeopathic preparations of *Phytolacca decandra* in development of mammary adenocarcinoma in mice. For this, 4T1 mammary carcinoma cells were inoculated subcutaneously near left inguinal breast in female BALB/c mice and then treated with water containing potencies of *Phytolacca decandra* 6, 12, 30, 200CH or dynamized vehicle (control), blinded for 21 days. Tumor growth was monitored in alternated days during this period, then animals were sacrificed and tumor, spleen, and lungs were removed during necropsy for histological and immunohistochemical studies. Results showed that animals treated with 30CH presented growth delay and less tumor weight, less vascularization and smaller values in to relative spleen weight and fewer lung metastasis when compared to other groups. Group treated with 12CH while presenting similar results to 30CH potency, however, no significant reduction in tumor growth. In contrast, in immunohistochemical analyzes 12CH group had more intense marking of mutant p53, lower expression of caspase-3 and increased expression of c-erbB-2. The 6CH group showed higher vascularization and expression of mutant p53 in tumor cells and high expression of caspase-3. In summary, this pilot study shows that treatment with 30CH potency induces delayed of breast tumor growth suggesting that this potency may be a promising alternative in the treatment of breast cancer. In contrast, 12CH potency could be used in combination with conventional therapies in order to optimize the effects of these treatments.

Key words: Homeopathy, *Phytolacca decandra*, 4T1 mammary carcinoma cells, breast cancer, experimental oncology.

Financial support: CAPES/PROSUP.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	10
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	12
<b>2.1. O câncer.....</b>	12
<b>2.2. Homeopatia e <i>Phytolacca decandra</i>.....</b>	13
<b>2.3. Modelo Animal e células 4T1.....</b>	15
<b>2.3. Marcadores moleculares para prognóstico de evolução tumoral</b>	16
<b>3. OBJETIVO.....</b>	18
<b>4. MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	19
<b>4.1. Animais.....</b>	19
4.1.1. Peso dos animais.....	19
4.1.2. Peso dos baço .....	19
<b>4.2. Tumor .....</b>	20
4.2.1. Cultura das células 4T1 .....	20
4.2.2. Inoculação tumoral.....	20
4.2.3. Crescimento tumoral .....	20
4.2.4. Peso do tumor .....	21
<b>4.3. Tratamento .....</b>	21
4.3.1. Escolha das potências .....	21
4.3.2. Preparação das Potências de <i>Phytolacca decandra</i> .....	21
4.3.3. Administração dos medicamentos .....	22
<b>4.4. Análises histopatológicas .....</b>	22
4.4.1. Razão polpa branca/polpa vermelha .....	22
4.4.2. Hemorragia/Congestão .....	23
4.4.3. Fibrose .....	23
4.4.4. Vascularização .....	23
4.4.5. Focos de metástase no pulmão .....	24
<b>4.5. Imunohistoquímica .....</b>	24
4.5.1. Caspase-3 .....	25
4.5.2. c-erbB-2 .....	25
4.5.3. p53 mutante.....	25
<b>4.6. Análises estatísticas.....</b>	26
<b>5. RESULTADOS .....</b>	27
<b>5.1. Peso dos camundongos .....</b>	27
<b>5.2. Crescimento tumoral .....</b>	28
<b>5.3. Peso do tumor.....</b>	30
<b>5.4. Peso relativo do baço .....</b>	30
<b>5.5. Análises Histopatológicas .....</b>	31
5.5.1. Razão polpa branca/polpa vermelha .....	31
5.5.2. Congestão/Hemorragia .....	32

5.5.3. Vascularização .....	34
5.5.4. Fibrose no pulmão .....	34
5.5.5. Focos metástase no pulmão .....	37
<b>5.6. Imunohistoquímica .....</b>	<b>37</b>
5.6.1. Caspase-3 .....	37
5.6.2. c-erbB-2 .....	38
5.6.3. p53 mutante.....	39
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>57</b>
Anexo 1. Certificado comitê de ética.....	57
Anexo 2. Procedimento imunohistoquímica APC – Lab.....	58

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde em todo o mundo e uma das causas mais relevantes de morbidade e mortalidade em crianças e adultos. Surge da proliferação e disseminação de clones de células que possuem atividade proliferativa desregulada, resistência à morte, capacidade de invadir tecidos e desenvolver metástases ou tumores secundários distantes do sítio primário (HANAHAN *et al.*, 2011). Entre os tipos de neoplasias, o câncer de mama é o mais comum entre a população feminina, representando um dos principais problemas de morbi/mortalidade nesse grupo. Isto devido a que tanto o prognóstico como o tratamento desse tipo de neoplasia é determinado de acordo com a extensão do tumor, disseminação para linfonodos e a presença clínica de metástases. Estima-se que 80% dos casos de câncer de mama recebem tratamento adjuvante desnecessário para prevenir possíveis metástases e na maioria das vezes esses tratamentos têm efeitos adversos tóxicos (CALDAS & APARICIO, 2002). Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de descobrir novas alternativas terapêuticas mais eficientes e com menos efeitos colaterais. Entretanto no momento, muitas dessas pesquisas estão em fase inicial de desenvolvimento.

Terapias alternativas e complementares têm sido definidas como uma variedade de sistemas médicos e terapias baseadas no conhecimento, habilidades e práticas derivadas tanto de teorias filosóficas como de experiências utilizadas em prol da melhora da qualidade de vida e/ou cura de doenças (SHNEERSON *et al.*; 2013). Em pacientes com câncer, terapias alternativas e complementares são utilizadas amplamente, sendo adotadas por até 40% dos usuários. 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 adversos quando utilizada junto com o tratamento tradicional (GAERTNER *et al.*, 2014, FRASS *et al.*, 2015).

Os medicamentos homeopáticos são geralmente preparados em doses infinitesimais (doses muito diluídas) e dinamizados (ADLER *et al.*, 1996) sendo utilizados em indivíduos com doenças parasitárias, virais, neoplásicas, comportamentais, entre outras (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). A homeopatia é uma terapia eficiente e segura no tratamento de doenças crônicas, baseia-se no tratamento pela similitude e utiliza medicamentos diluídos e dinamizados. Ela aumenta a eficácia clínica e a qualidade de vida, diminui os custos e os efeitos colaterais da terapêutica farmacológica convencional (TEIXEIRA, 2006).

Um exemplo da eficiência da homeopatia é demonstrado na prática clínica na Índia, onde a homeopatia foi institucionalizada em 1839 e atualmente está incluída nos programas governamentais. Em 2009 já contava com 307 hospitais homeopáticos além do Conselho Central de Homeopatia, que tem como foco a formação de profissionais e o Conselho Central para Pesquisa em Homeopatia (RASTOGI, 2009). O uso da homeopatia em pacientes indianos é bem-sucedido e reconhecido pelas pesquisas em pacientes, inclusive com doenças crônicas (KOLEY *et al.*, 2016; SAHA *et al.*, 2014) e sua utilização pode ser constatada através de protocolos como o Banerji em instituições de saúde do mundo como o *National Care Institute* nos Estados Unidos (BANERJI, 2008).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O câncer

O câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda do controle da proliferação celular e ganho da capacidade para invadir tecidos adjacentes formando tumores secundários ou metástases. Cerca de 5 a 10% das neoplasias são resultados diretos da herança genética relacionadas ao câncer, porém grande parte envolve danos ao material genético de origem física, química ou biológica, que se acumulam ao longo da vida (ADAMI *et al.*, 2001). Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública ao ser considerado como a segunda maior causa de morte da população mundial perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (BRAGHIROLI, 2014).

Entre os diferentes tipos de neoplasias, o câncer de mama é o mais comum na população feminina mundial. Estima-se que mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama a cada ano na população mundial, e mais de 410 mil morrerão da doença. Na Grã-Bretanha e Estados Unidos, uma em cada dez mulheres desenvolve câncer de mama e metade delas morrerão pela doença (CALDAS & APARICIO, 2002). No Brasil a estimativa é de 57.960 casos novos para o ano de 2016 (BRASIL, 2016a, 2016b). Em países de baixa e média renda, a infraestrutura e recursos para mamografias de rotina são muitas vezes indisponíveis. Nessas configurações de recursos precários, o câncer de mama é comumente diagnosticado em estágios avançados e, por não receber tratamento adequado quando identificado, o tumor avança e coloniza outros órgãos formando metástases que levam a uma piora do prognóstico (COUGHLIN & EKWUEME, 2009).

As metástases são tumores secundários que crescem em lugares distantes do tumor primário, cuja presença em qualquer tipo de neoplasia aumenta e muito o risco de morte na maioria dos pacientes com câncer. A formação das metástases envolve etapas complexas para as quais somente células tumorais com características específicas conseguem sair do foco primário, passar e sobreviver na corrente sanguínea para posteriormente, invadir e colonizar órgãos ou tecidos distantes do tumor primário e formar tumores secundários ou metástases (WEIGELT *et al.*, 2005; VEER & WEIGELT, 2003).

Diversos fatores podem contribuir na formação de neoplasias, estes podem ser tanto externos como internos ao organismo, porém inter-relacionados entre si. Os fatores internos, na maioria das vezes são geneticamente predeterminados e estão ligados à capacidade do organismo responder a estímulos externos. Já os fatores externos referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade sendo responsáveis por 80 a 90% dos casos de câncer conhecidos (BRASIL, 2016 b). Assim, levando em consideração que o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade do século, diversos grupos de pesquisa apontam na descoberta de novas alternativas terapêuticas mais eficientes e de menor custo para o tratamento do câncer.

## **2.2. Homeopatia e *Phytolacca decandra***

O termo homeopatia, apesar de ser conhecido, ainda gera alguma confusão quanto à sua definição, pois muitas vezes é utilizado como sinônimo para doses infinitesimais ou medicamentos dinamizados, sem considerar a “Lei do Semelhante” (ADLER *et al.*, 1996). Dinamização é o processo de diluição seguido de sucussões sucessivas do insumo ativo em um insumo inerte adequado e potência é a indicação quantitativa do número de dinamizações que uma matriz ou um medicamento homeopático receberam. É indicada pelo número que corresponde ao número de dinamizações, seguido da escala de diluição (C para centesimal e D decimal) e o método (H para Hahnemanniano e K para Korsakov), assim a potência 30CH corresponde à dinamização 30 realizada na escala centesimal com método Hahnemanniano (BRASIL, 2016).

O princípio de “semelhante cura semelhante” é entendido como a correlação entre os sintomas manifestados espontaneamente por um paciente e os sintomas provocados por uma ou mais substâncias conforme seus aspectos toxicológicos e patogenéticos (BONAMIN, 2008), entretanto, os estudos baseados nesse princípio de similitude são escassos na literatura (BONAMIM, 2010; BONAMIN, 2015).

A *Phytolacca decandra*, também conhecida como *Phytolacca americana* ou *Pokeweed*, é uma planta ornamental da família *Phytolaccaceae*, contendo terpenoides, taninos, saponinas, alcaloides, resinas e o ácido phytolaccico como principais ingredientes bioativos (GHOSH *et al.*, 2013). É um medicamento tradicional homeopático cuja planta pode ser encontrada na Europa, Oeste, Sul da

França e América do Norte (RAVIKIRAN & VENUGOPAL, 2011). Com base nos dados patogenéticos obtidos pela experimentação no homem são, a *Phytolocca decandra* ocasiona sintomas semelhantes aos apresentados em indivíduos com câncer. Atua sobre as mucosas da faringe, glândulas mamárias e gânglios, músculos, periósteo e ossos (VANNIER & POIRIER, 1987; RAVIKIRAN & VENUGOPAL, 2011; BRODIE, 2002). No Guia de Medicina Homeopática do Dr. Nilo Cairo, consta a seguinte descrição para *Phytolacca decandra*: "Seios endurecidos, dores nos seios durante as regras, mastite (um grande remédio), seios duros, inchados, dolorosos, tumores nos seios, bicos rachados e dolorosos", e no trecho final cita uma declaração de Dr. Copperthwaite, "Eu considero *Phytolacca decandra* o mais valioso agente local no tratamento de quase todas as formas de tumores mamários" (CAIRO; 1984). A tintura-mãe da *Phytolocca* é utilizada contra reumatismo crônico, conjuntivite regular, psoríase e doenças de pele (GHOSH et al., 2013). O seu extrato é utilizado na medicina tradicional chinesa há séculos, no tratamento de tumores, edemas, bronquite e abcessos (DAS, et al., 2013).

Estudos com saponinas isoladas do extrato da *Phytolacca decandra* demonstraram atividade citotóxica contra câncer de mama e de cólon (DAS et al., 2012). Uma neolignana isolada das sementes da planta, também apresentou atividade citotóxica no câncer de cólon (JUNG et al., 2015). O extrato hidroalcoólico demonstrou atividade citotóxica contra carcinoma hepatocelular de mama e cólon (DAS et al., 2012). Efeitos antitumorais do extrato etanólico da *Phytolacca decandra* já foram demonstrados em estudos com câncer de pele (GHOSH et al., 2013) e adenocarcinoma de pulmão, nesse caso com um triterpenoide isolado do extrato (DAS et al., 2013; DAS et al., 2014), ambos por indução de apoptose.

A *Phytolacca decandra* dinamizada já foi estudada para búfalos e gado com resultados positivos em mastites (SEARCY et al., 1995; VARSHNEY & NARESH, 2004). Outros estudos demonstraram atividade antiviral (anti-AIDS) além dos efeitos anticâncer (RAVIKIRAN & VENUGOPAL, 2011).

Os mecanismos de ação dos medicamentos homeopáticos têm sido debatidos amplamente, por isso diferentes laboratórios de pesquisa sugerem os caminhos de ação desses medicamentos. Nos últimos anos, estudos experimentais com altas diluições demonstraram efeito imunomodulador de preparações homeopáticas (SATO et al., 2004; ZALLA, 2006; BONAMIN et al., 2012). Em 2007, Garritano definiu as matérias-primas de produtos homeopáticos como substâncias

imunomoduladoras que visam à recuperação do equilíbrio do sistema imunológico, além de garantir a proteção do indivíduo contra vários agentes infecciosos de diferentes origens (GARRITANO, 2007). Uma das hipóteses sugeridas para explicar os possíveis mecanismos de ação anticâncer dos remédios homeopáticos, inclui a sinalização célula a célula, que pode promover efeitos pró-apoptóticos e anti-proliferativos (FRENKEL *et al.*, 2010; BELL *et al.*, 2014) por modulação bioquímica ou por alteração na expressão gênica (BISWAS *et al.*, 2005; BHATTACHARJEE *et al.*, 2009; KHUDA-BUKHSH, 2012; BIGAGLI *et al.*, 2014), como mostrado por Khuda-Bukhsh e Mannes no câncer de pele e de cólon, respectivamente (KHUDA-BUKHSH *et al.*, 2011; MANESS *et al.*, 2013).

### **2.3. Modelo animal e Células 4T1**

Os modelos animais simulam condições humanas de uma doença ou condição que pode ser induzida tanto geneticamente como de forma experimental, para avaliar diferentes aspectos da doença ou do comportamento geral do indivíduo (animal) que desenvolve a doença ou alteração genética/ambiental (KHUDA-BUKHSH, 2009). Com o objetivo de identificar alvos terapêuticos, contribuir na compreensão dos mecanismos de desenvolvimento tumoral e avaliar a eficácia e segurança de agentes terapêuticos, modelos com camundongos para o estudo do câncer são amplamente utilizados (FANTOSI & CHRISTOFORI, 2006; SUNILA *et al.*, 2007).

Em homeopatia, os modelos animais são utilizados com o objetivo de elucidar características biológicas e o modo de ação das altas diluições nos organismos vivos. Diversos modelos animais são encontrados na literatura para demonstrar de forma adequada o princípio da similitude (BONAMIN, 2010; BONAMIN, 2015). Nesse contexto, modelos com camundongos são utilizados nos modelos experimentais por compartilhar características semelhantes aos humanos, com 85% de similaridade genômica (KHUDA-BUKHSH, 2009). As células de adenocarcinoma mamário 4T1 são uma linhagem de células tumorais transplantáveis (PULASK & OSTRAND-ROENBERG, 2000), isoladas de uma subpopulação de camundongos BALB/c que originou espontaneamente o tumor mamário (DUPRE *et al.*, 2007). O tumor de células 4T1 é metastático e invasivo, podendo espontaneamente produzir metástases para diferentes locais como: linfonodos, fígado, pulmões, ossos e

cérebro; comportando-se de forma semelhante ao câncer de mama humano (PULASK & OSTRAND-ROENBERG, 2000; DUPRE *et al.*, 2007).

#### **2.4. Marcadores Moleculares para prognóstico de evolução tumoral**

O perfil molecular, antes ou após a remoção do tumor, pode oferecer previsões mais precisas se haverá ou não metástases (CALDAS & APARICIO, 2002; FANTOZZI & CHRISTOFORI, 2006). Alguns marcadores são reconhecidos como fatores prognósticos, como os marcadores de proliferação celular, genes supressores de tumor e oncogenes (SILVA *et al.*, 2002). Marcadores moleculares ou tumorais são substâncias presentes no tumor e no sangue, bem como em outros líquidos biológicos produzidos pelo tumor ou em resposta a ele, que podem ser localizados em cortes de tecido por técnicas de imunohistoquímica (EISENBERG & KOIFMAN, 2001).

O gene p53 mutante é frequentemente encontrado em cânceres e está mutado em cerca de 50% dos tumores humanos, é proveniente de uma alteração com consequente perda de atividade do gene p53, um supressor de tumor que exerce função de guardião celular por reconhecer danos no DNA e controlar crescimento e morte celular (ALMEIDA *et al.*, 2007, SILVA *et al.*, 2002; ZUCCARI *et al.*, 2008).

O oncogene c-erbB-2 (Her-2/neu) está presente em cerca de um quarto dos tumores de mama e está relacionado com sobrevida. É uma proteína transmembrana que se autofosforila e ativa mecanismos de transdução de sinais, desencadeando resposta de divisão celular (SILVA *et al.*, 2002, ZUCCARI *et al.*, 2008). Apresenta importância no tratamento de pacientes com câncer de mama, relacionando a expressão desse gene com a dose de quimioterápico que será utilizada (ALMEIDA *et al.*, 2007)

Mutações tanto no receptor para fator de crescimento (Her-2) como na proteína p53 fazem com que as células passem a se dividir sem restrições e de forma defeituosa, podendo levar à formação de tumores malignos como resultado da ativação de oncogenes e desativação dos genes supressores (ZUCCARI *et al.*, 2008).

Outro marcador utilizado é a Caspase-3, protease fundamental para eliminação de células tumorais que é ativada mediante vários estímulos e desencadeia mecanismos de morte celular (ZUCCARI *et al.*, 2008). A ativação da

caspase-3 pode ser via receptor da família TNF, via extrínseca, ou pela liberação de citocromo c pela mitocôndria (via intrínseca), mediada pela caspase-9, ambas as vias resultando em apoptose (PORTER, 2006).

Assim, levando em consideração que o modelo de adenocarcinoma mamário de células 4T1 pode trazer informações importantes na compreensão dos mecanismos biológicos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama, o estudo dos efeitos das potências de *Phytolacca decandra* nesse modelo pode contribuir no estabelecimento de novas alternativas terapêuticas eficientes e de baixo custo para tumores potencialmente agressivos.

### **3. OBJETIVO**

Estudar os efeitos de preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* em diferentes potências no crescimento e metastatização de células de adenocarcinoma mamário 4T1.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c adultos, randomizados para garantir a homogeneidade das amostras, pesando entre 25 e 30 gramas, fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Paulista (Protocolo N° 283/15 CEP/ICS/UNIP, Anexo 1).

Para este trabalho foram utilizados 20 animais divididos em 5 grupos com 4 animais. O estudo foi realizado em cego, portanto cada grupo foi codificado. Os animais foram mantidos em microisoladores (Techniplast®), livres de germes, no biotério de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas da UNIP (Campus Indianópolis), com água e ração autoclavadas *ad libitum*, temperatura e umidade controlados ( $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 55 - 65% URL) e com ciclo de luz de 12 horas.

Os procedimentos realizados nos animais produziram mínimo desconforto, portanto não foi necessário nenhum tipo de analgesia. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e após verificar a morte por ausência de batimento cardíaco foram necropsiados para retirada de massa tumoral primária, baço e pulmões para posteriores análises histológicas.

#### 4.1.1. Peso dos animais

A fim de verificar se o medicamento utilizado poderia afetar o estado geral dos animais, o peso dos camundongos de cada grupo foi determinado. Para isso, medidas do peso foram realizadas semanalmente em todos os animais de cada grupo a partir do dia do desafio com as células tumorais.

#### 4.1.2. Peso do baço

A fim de se identificar possíveis diferenças do peso relativo do baço em cada situação experimental, o baço foi removido durante a necropsia para determinação do seu peso em balança analítica (OHAUS, São Bernardo do Campo, SP). Para o

cálculo do peso relativo, o peso do baço foi dividido pelo peso total do camundongo determinado no momento da eutanásia. Esta razão peso do baço/peso corporal foi utilizada para evitar que as oscilações de peso corporal mascarassem as alterações (GOMES *et al.*, 2008).

## 4.2. Tumor

### 4.2.1. Cultura das células 4T1

Células de adenocarcinoma mamário 4T1 foram cultivadas em meio completo composto de RPMI (Sigma, St Louis, MO) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de ciprofloxacina (Cultilab, Campinas, SP), em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O descolamento das células para posteriores ensaios foi realizado por breve exposição à tripsina (TrypLe – Invitrogen, Carlsbad, CA).

### 4.2.2. Inoculação tumoral

Os animais foram injetados na região subcutânea da mama esquerda inguinal, com 2 x 10<sup>4</sup> células de adenocarcinoma mamário 4T1, ressuspensas em 50 µl de PBS 1X.

### 4.2.3. Crescimento tumoral

O crescimento da massa tumoral foi medido em dias alternados com paquímetro digital Digimess®, comprimento x largura, a partir do quinto dia, após desafio tumoral até o momento da eutanásia em 21 dias (morte do primeiro animal).

Para o cálculo do volume tumoral foi utilizada a fórmula:

$$V(\text{mm}^3) = d^2 * \left(\frac{D}{2}\right)$$

Onde d é o valor menor e D o valor maior das medidas de comprimento e largura realizadas diariamente (DUPRE *et al.*, 2007).

#### 4.2.4. Peso do Tumor

Após 21 dias do desafio tumoral os animais foram eutanasiados e o tumor foi retirado durante a necropsia com cuidado para evitar perda do material, conforme o protocolo “Mouse 4T1 Breast tumor” (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2000). Em seguida, o tumor foi pesado em balança analítica e transferido para tubo contendo paraformaldeído 10% para posteriores análises histológicas.

### 4.3. Tratamento

#### 4.3.1. Escolha das potências

A escolha das potências na clínica médica, geralmente se baseia na experiência e na prática clínica (TEIXEIRA, 1995). Assim, para este trabalho foram utilizadas quatro potências selecionadas com base na literatura e experiência farmacêutica. A potência 6CH foi escolhida como potência abaixo do número de Avogadro ( $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ), a 12CH como potência limite que se extrapola a constante de Avogadro, 30CH potência sugerida por Hahnemann como preferível em quase todos os casos (TEIXEIRA, 1995) e, 200CH potência utilizada nos protocolos de Banerji (BELL *et al.*, 2014).

#### 4.3.2. Preparação das Dinamizações de *Phytolacca decandra*

Foram utilizadas matrizes de *Phytolacca decandra* provenientes do Laboratório Schraiber do Brasil, nas potências 4CH, 11CH, 29CH e 199CH (lotes: 2669124, 2669125, 2669126 e 2669127, respectivamente, todos com validade para fevereiro de 2019).

As últimas dinamizações para as potências de estudo foram realizadas no laboratório da Universidade Paulista – Unip, utilizando o braço mecânico Autic®, de acordo com o procedimento estabelecido na Farmacopeia Homeopática Brasileira - FHB 3 (BRASIL, 2011), usando a escala Centesimal Hahnemaniana (CH). Como controle foi utilizado o veículo dinamizado (solução hidroalcoólica 30%), usando o mesmo procedimento determinado na Farmacopeia Homeopática Brasileira.

#### 4.3.3. Administração dos medicamentos

Os animais foram tratados diariamente com *Phytolacca decandra* 6CH, 12CH, 30CH, 200CH ou veículo, diluídos na água de bebida, em cego, do dia da inoculação com as células tumorais até eutanásia.

Para o tratamento da água de bebida foi utilizado 100 µL da potência respectiva ou veículo (controle) adicionados a 250 mL de água estéril (SANTANA et al., 2013).

Para o procedimento em cego, os frascos contendo cada uma das quatro (4) potências de *Phytolacca decandra* e o veículo, foram identificados aleatoriamente com as letras A, B, C, D e E, por funcionário do laboratório não envolvido em nenhuma etapa do processo experimental. Os códigos foram revelados após análises estatísticas.

#### 4.4. Análises histopatológicas (histometria)

Após eutanásia dos animais, pulmões, baço e tumor foram retirados durante a necropsia e em seguida, fixados em paraformaldeído 10%. Os fragmentos dos tecidos foram submetidos aos procedimentos rotineiros de processamento histológico, emblocagem em parafina e microtomia, dispondo-se cortes teciduais de 5 µm de espessura sobre lâminas histológicas e corados pelos métodos de hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson. As análises foram realizadas e fotografadas em fotomicroscópio NIKON E200 (Shinagawa, Tokyo, JP), acoplado à câmera NIKON Coolpix. Para as análises de imunohistoquímica, os blocos com os fragmentos foram enviados ao Laboratório de Apoio em Patologia Cirúrgica - APC Lab (Licença de funcionamento 355030890-864-013027-1-0) para processamento dos cortes no próprio laboratório conforme procedimento anexo (Anexo 2).

##### 4.4.1. Razão Polpa Branca/Polpa Vermelha

Para investigar possível atividade celular linfocitária, foi determinada a razão entre a polpa branca e a polpa vermelha. Para isto, fragmentos de baço foram corados com hematoxilina-eosina fotografadas em aumento de 10x. Análises foram realizadas no software Metamorph®, utilizando a ferramenta de contorno manual,

medindo separadamente as áreas selecionadas de polpa branca e polpa vermelha em pixels para o cálculo da razão.

#### 4.4.2. Hemorragia/Congestão

Fragmentos de pulmão colhidos durante a necropsia foram corados com hematoxilina-eosina. Para determinar a ação das homeopatias em relação ao grau de hemorragia e congestão, as lâminas foram fotografadas e as imagens avaliadas no software Metamorph® utilizando a ferramenta para marcação de campos escuros (*threshold*), separando áreas avermelhadas das demais, de forma que somente os aglomerados de hemácias foram considerados na contagem (área medida em pixels).

#### 4.4.3. Fibrose

Para análise da fibrose, lâminas de pulmão foram avaliadas para identificar áreas de reparo caracterizadas pela presença de fibras colágenas por meio da coloração azul que assumem quando coradas com Tricrômico de Masson. As lâminas foram fotografadas em aumento de 40x e analisadas no software Metamorph® utilizando a ferramenta *threshold*, separando áreas marcadas em azul das demais (área medida em pixels), de forma que somente o colágeno foi considerado na análise.

#### 4.4.4. Vascularização

Para avaliar a vascularização das amostras de tumor, cortes corados com hematoxilina-eosina foram analisados para detecção da presença de células sanguíneas. As lâminas de tumor foram fotografadas em aumento de 40x e analisadas no software ImageJ® usando a ferramenta *threshold*, seguindo os mesmos critérios descritos em 4.4.2.

#### 4.4.5. Focos de metástase no pulmão

Lâminas de pulmão foram avaliadas em aumento de 40x em toda extensão do

corte, para avaliar presença de focos de metástase caracterizados por pequenos acúmulos de células tumorais no meio do tecido. A confirmação dos focos metastáticos foi realizada no aumento de 100x por imersão. Os fragmentos foram corados com hematoxilina-eosina e número de focos de metástase foram identificados e contados manualmente com auxílio do aplicativo “*Manual Blood Cell Counter*” da *Apple Store*®.

#### 4.5. Imunohistoquímica

As lâminas de imunohistoquímica foram preparadas pelo Laboratório de Apoio em Patologia Cirúrgica - APC Lab e analisadas no Centro de Pesquisas da Unip. Após imunomarcação, de vinte (20) a trinta (30) fotografias foram realizadas de forma aleatória das lâminas utilizando o fotomicroscópio e câmera NIKON. Áreas com marcação inespecífica foram excluídas, evitando-se áreas de necrose. As marcações realizadas pelo Laboratório APC-Lab realizadas segundo protocolos já padronizados por eles (Anexo2) foram:

- **c-erbB-2:** Anticorpo concentrado marca SPRING – clone: SP3, cód: M3034, diluição 1:200, recuperação pH Baixo.
- **p53 mutante:** anticorpo Flex (pré-diluído) marca DAKO – clone: DO-7, cód: IR61661-2 já pré-diluído, recuperação pH Alto.
- **Caspase-3:** anticorpo concentrado marca ABCAM – clone 31<sup>a</sup>10671, cód: 13585, diluição 1:100, – recuperação pH Alto.

A metodologia para realização está descrita no procedimento POP – APC – 005 apresentado em anexo (Anexo2).

Para análise das lâminas foi utilizado o software ImageJ® com diferentes parâmetros para cada marcador e caso, conforme descrito abaixo:

##### 4.5.1. Caspase-3

Toda extensão da lâmina foi avaliada em fotomicroscópio. Fotografias das áreas positivas para Caspase-3 foram analisadas no software ImageJ® utilizando a ferramenta *threshold*. As áreas marcadas em marrom foram avaliadas em pixels.

#### 4.5.2. c-erbB-2

Toda extensão da lâmina foi avaliada em fotomicroscópio. Áreas positivas para c-erbB-2 foram fotografadas e as marcações contadas no software ImageJ® utilizando a ferramenta de contagem manual. O número de células marcadas por campo em unidades foi utilizado para as análises.

#### 4.5.3. p53 mutante

Toda extensão da lâmina foi avaliada em fotomicroscópio. Áreas positivas para p53 mutante foram avaliadas de dois modos para esse marcador: **Intensidade de marcação** e **área de marcação** pelo ImageJ® em pixels.

Na **intensidade de marcação** foi avaliada toda a extensão do corte, separado das áreas de necrose, que foram avaliadas separadamente, utilizando a ferramenta IHC *toolbar* do software ImageJ®. A ferramenta IHC *toolbar* foi desenvolvida para detectar coloração DAB e calibrada utilizando como marcador o p53 (SHU *et al.*, 2010). A coloração identificada é transformada em tons de cinza de modo que se possa determinar a distribuição de intensidade da marcação. Para isso, o software gera um histograma com a quantidade de pixels da imagem distribuídos em uma escala de 0 a 255, onde zero é totalmente preto e 255 é totalmente branco. Foi utilizada para análise a média ponderada da intensidade tendo como peso essa escala, desconsiderando apenas os pixels marcados em branco total (o programa considera tudo que não é marcação DAB como branco).

Na **área de marcação**, os campos selecionados (padronizados por campos com maior marcação) foram analisados utilizando o software ImageJ® utilizando a ferramenta *threshold*. As áreas marcadas em marrom foram avaliadas em pixels.

### 4.6. Análises estatísticas

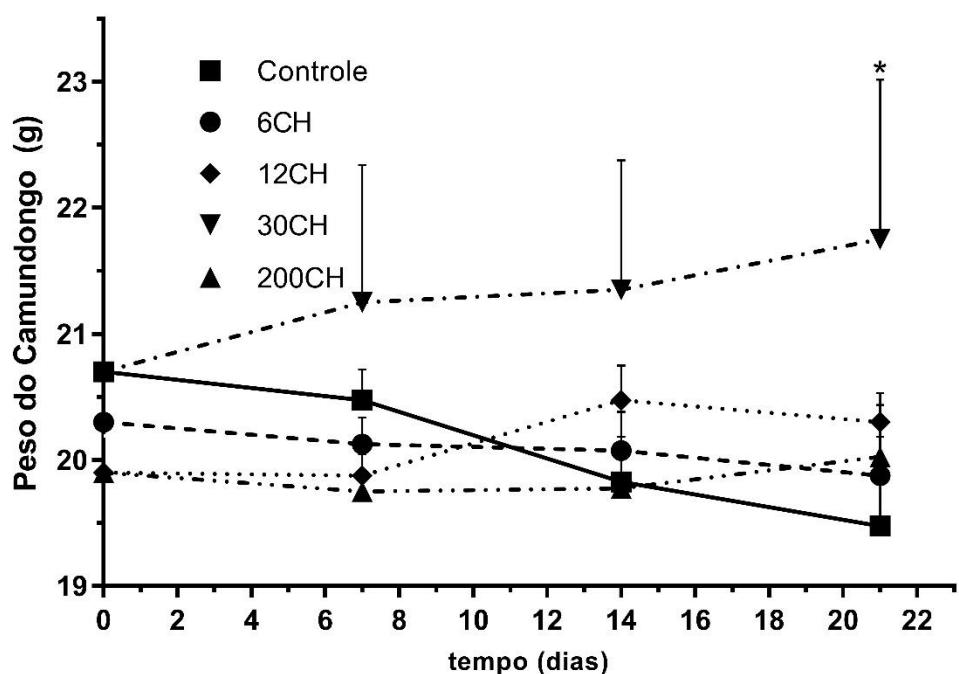
Os dados foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Conforme os resultados do teste de normalidade, as amostras classificadas como paramétricas foram submetidas ao teste ANOVA de uma ou duas vias ou ao teste de Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos. Diferenças com valor de  $p \leq$

0,05 foram consideradas estatisticamente significantes. As análises e gráficos foram realizados com o auxílio do *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 6,07.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Peso dos Camundongos

Análises da variação de peso dos camundongos durante o tempo de tratamento demonstraram que animais tratados com *Phytolacca decandra* na potência 30CH perderam menos peso quando comparados aos animais do grupo controle (veículo dinamizado, Figura 1). Os outros grupos de tratamento (6CH, 12CH e 200CH) demonstraram uma tendência de redução de peso, porém não significante quando comparados com o grupo controle (Tabela 1).



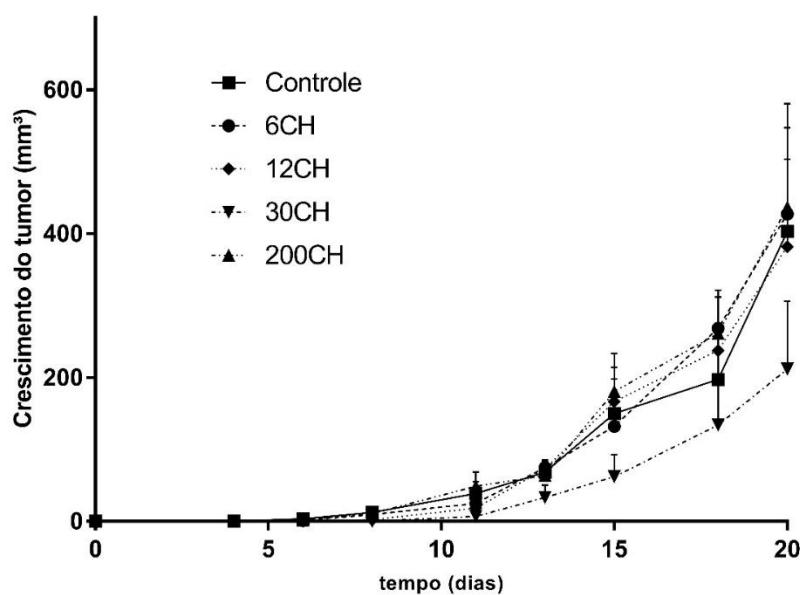
**Figura 1. Influência das potências de *Phytolacca decandra* no peso dos animais após inoculação com células tumorais.** Camundongos tratados com o controle (veículo dinamizado) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH) foram pesados semanalmente a partir do dia da inoculação com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 até o dia da eutanásia. Animais foram tratados logo após inoculação com as células tumorais. Pontos representam o valor médio das medidas do peso dos camundongos de cada grupo com o respectivo erro padrão. \*  $p < 0,05$ , Anova duas vias.

**Tabela 1.** Variação do peso (g) dos camundongos por grupo em função do tempo. Média das medidas de peso e erro padrão de cada grupo: tratados com o veículo (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH) em relação ao tempo, após injeção de células tumorais (0, 7, 14 ou 21 dias após inoculação). Setas indicam variação da média do peso do grupo comparado com a média do dia do desafio tumoral.

Amostras Tempo \	Controle	6CH	12CH	30CH	200CH
0	20.73 ± 0,00	20.31 ± 0,00	19.86 ± 0,00	20.74 ± 0,00	19.92 ± 0,00
7	20.48 ± 0,24	20.12 ± 0,21	19.86 ± 0,09	21.24 ± 1,10	19.74 ± 0,17
14	19.80 ± 0,36	20.08 ± 0,31	20.47 ± 0,11	21.37 ± 1,03	19.76 ± 0,27
21	19.48 ± 0,98 ↓	19.88 ± 0,46 ↓	20.31 ± 0,16 ↑	21.77 ± 1,26 ↑	20.04 ± 0,24 ↑

## 5.2. Crescimento tumoral

A evolução do crescimento tumoral foi determinada pelo valor médio das medidas do volume tumoral de cada grupo em função do tempo após desafio com as células tumorais (Figura 2). A comparação dos grupos tratados com o veículo dinamizado (controle) e com diferentes potências de *Phytolacca decandra* não revelou diferenças estatísticas, entretanto o tratamento com potência 30CH mostra tendência de retardo no início do crescimento tumoral e crescimento final quando comparado com os outros grupos. (Tabela 2).



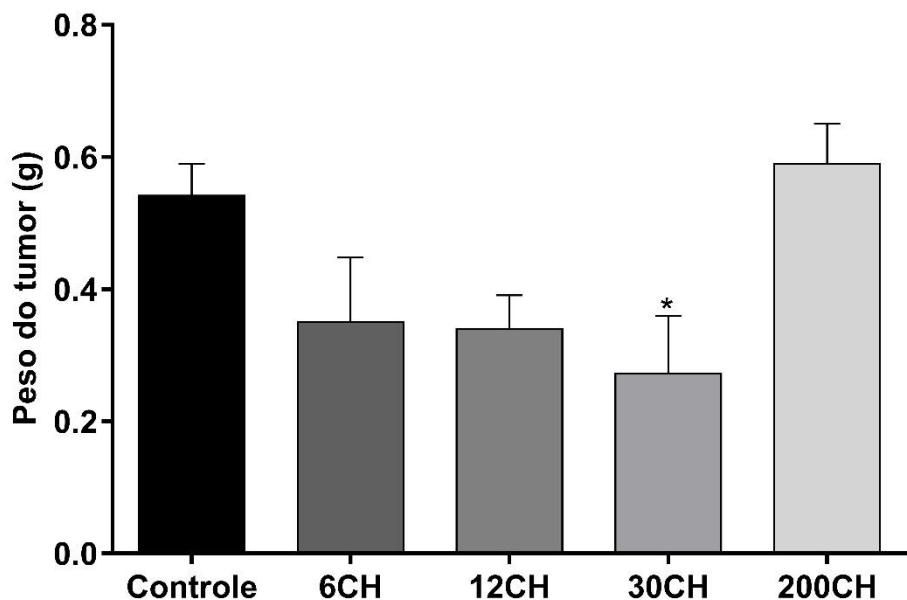
**Figura 2. Efeitos das potências de *Phytolacca decandra* em relação ao crescimento tumoral.** Camundongos BALB/c foram inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 de forma subcutânea na mama inguinal esquerda. Animais foram tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH) do dia da inoculação até o dia da eutanásia. O crescimento foi determinado pelo acompanhamento do volume tumoral, realizado em dias alternados com paquímetro. Para o cálculo do volume tumoral foram consideradas as medidas de altura e largura. Figuras geométricas representam a média das medidas de volume tumoral por grupo com o erro padrão. Sem diferença estatística. Anova duas vias.

**Tabela 2. Crescimento do tumor em função do tempo.** Medidas do volume tumoral em  $\text{mm}^3$  por grupo de tratamento (*Phytolacca decandra* 6CH, 12CH, 30CH e 200CH) e controle (veículo dinamizado). Tempo 0 corresponde ao dia de inoculação com células tumorais e tempo 20, um dia antes da eutanásia. Setas indicam comparação do grupo em relação ao controle.

Tempo (dias)	CONTROLE	6CH	12CH	30CH	200CH
0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
6	3,65	1,375	0	0	2,2
8	12,525	9,475	2,425	0	10,8
11	38,55	25,125	18,375	6,825	48,875
13	68,375	74,625	73,3	33	63,775
15	149,875	132,025	166,575	62,1	180,8
18	197,225	268,45	237,875	133,775	261,4
20	403,425	427,5 $\cong \uparrow$	381,7 $\cong \downarrow$	211,85 $\downarrow$	436,8 $\cong \uparrow$

### 5.3. Peso do tumor

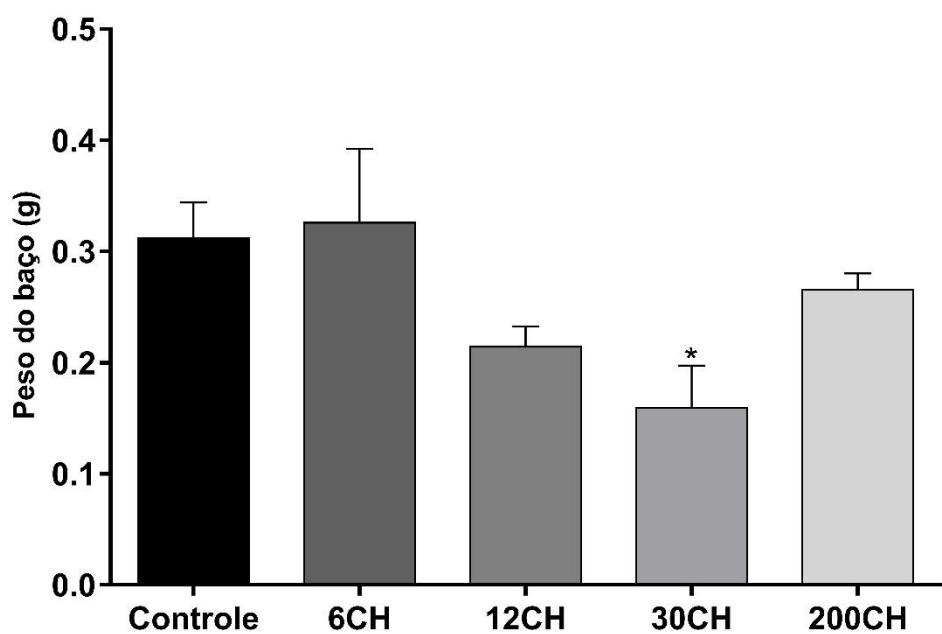
Os tumores retirados durante necropsia foram pesados e a média dos valores do peso de cada grupo de tratamento comparada com o grupo controle (Figura 3 e Tabela 3). Os animais tratados com *Phytolacca decandra* 30CH apresentaram peso do tumor (g) significativamente menor quando comparado com o controle.



**Figura 3. Peso do tumor:** Camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 via subcutânea na mama inguinal esquerda foram tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH) a partir do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Após eutanásia o tumor dos animais foi retirado durante necropsia para determinação do peso. Colunas representam a média do peso do tumor em gramas (g) por grupo de tratamento. \*  $p < 0,05$ , Anova uma via.

### 5.4. Peso relativo do Baço

Os baços retirados durante necropsia foram pesados para determinação do peso relativo calculado levando em consideração o peso total do animal. A média das medidas do peso do baço relativo ao peso total de cada animal apresentou valor menor nos animais tratados com *Phytolacca decandra* 30CH, quando comparados com o grupo controle (Figura 4 e Tabela 3).

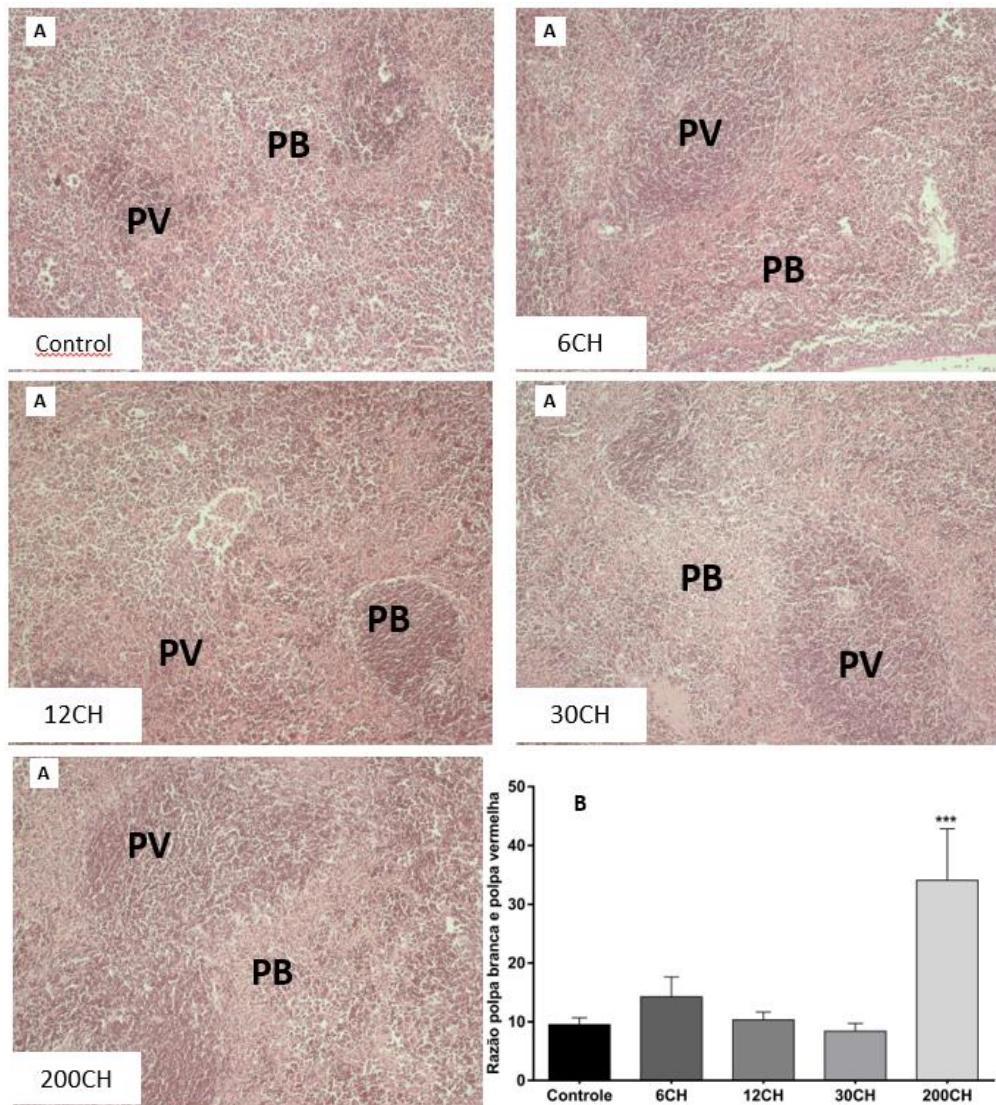


**Figura 4. Medias dos valores do peso relativo do baço entre os grupos.** Camundongos BALB/c foram inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 de forma subcutânea na mama inguinal esquerda. Animais foram tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH) do dia da inoculação até o dia da eutanásia. O baço dos animais foi retirado durante necropsia e pesados. Colunas representam a média dos valores relativos do peso do baço por grupo. Cálculo do peso relativo: peso do baço/ peso total do animal no dia da eutanásia. \*  $p < 0,05$ , Anova uma via.

## 5.5. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

### 5.5.1. Razão Polpa Branca e Polpa Vermelha

Fotomicrografias das lâminas de baço foram analisadas pelo software Metamorph®, para determinação das áreas em pixels de polpa branca (PB) e polpa vermelha (PV) para posterior cálculo da razão PB/PV em cada grupo. Como demonstrado na Figura 5, animais tratados com a potência 200CH apresentaram média da razão Polpa branca e Polpa vermelha significativamente maior quando comparada s com a média de PB/PV do controle (Figura 5, Tabela 3).

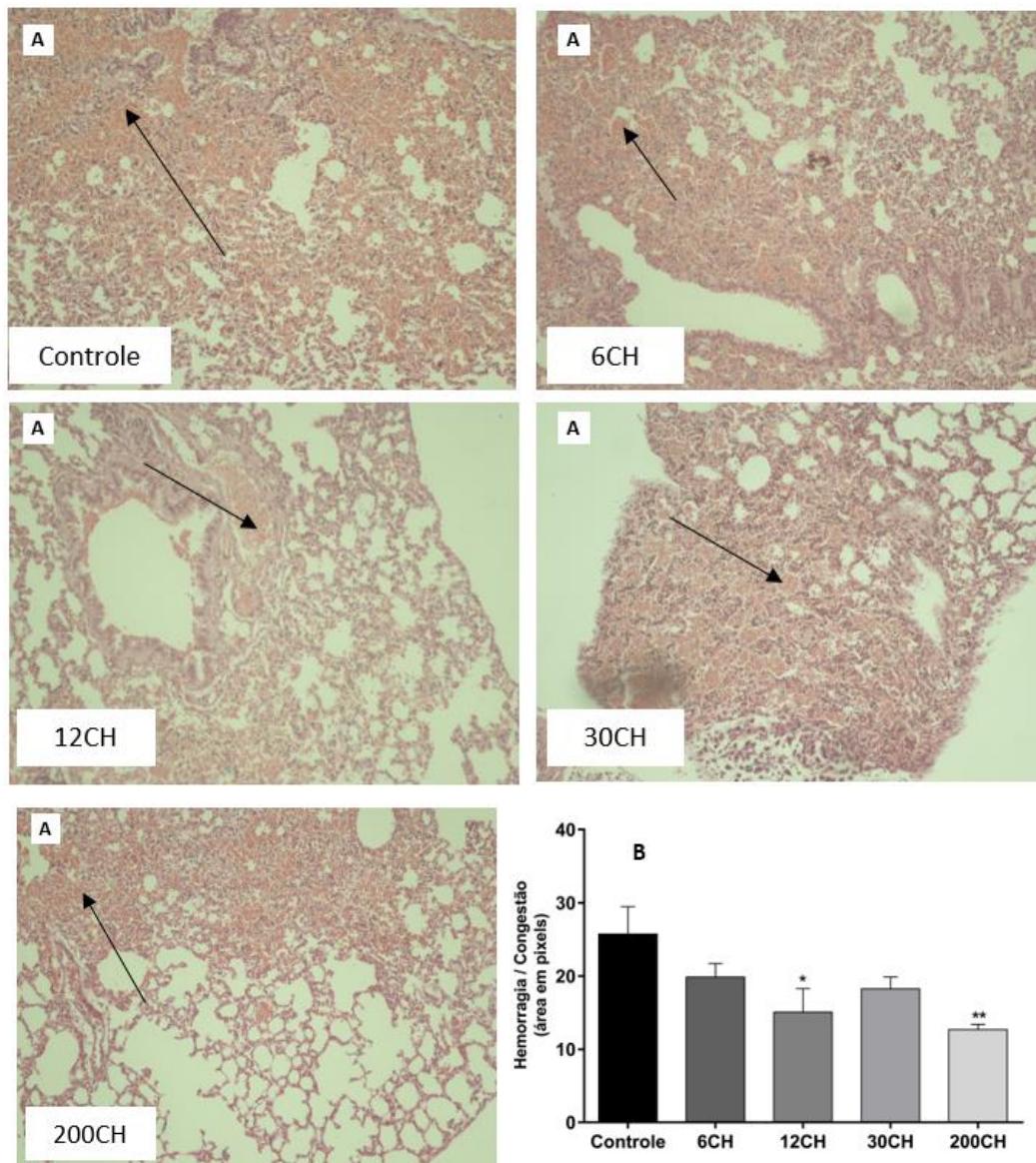


**Figura 5. Análises de baço: determinação de polpa branca e polpa vermelha.** A: Fotomicrografias representativas de lâminas com fragmentos de baço representando áreas de Polpa Branca (PB) e Polpa Vermelha (PV) em camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 e tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH), respectivamente do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Lâminas preparadas com corte de baço, coradas com hematoxilina-eosina, foram fotografadas em aumento de 10x e analisadas no *Metamorph®* para cálculo da área de PB e PV em pixels. B: Média das razões de polpa branca/polpa vermelha em cada grupo, determinado pela área em pixels. Colunas representam a média das razões PB/PV por grupo. \*  $p = 0,0001$  Anova uma via.

### 5.5.2. Hemorragia/Congestão

Para determinação da área em pixels das regiões de hemorragia/congestão como indicadores de alterações na integridade do tecido pulmonar, fotomicrografias das lâminas de pulmão foram analisadas pelo *software Metamorph®*, utilizando a ferramenta *threshold* (Figura 6). Resultados obtidos das análises das áreas de

hemorragia/congestão entre os grupos mostraram que animais tratados com as potências 12CH e 200CH apresentaram área de hemorragia/congestão significativamente menor quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 6, Tabela 3).



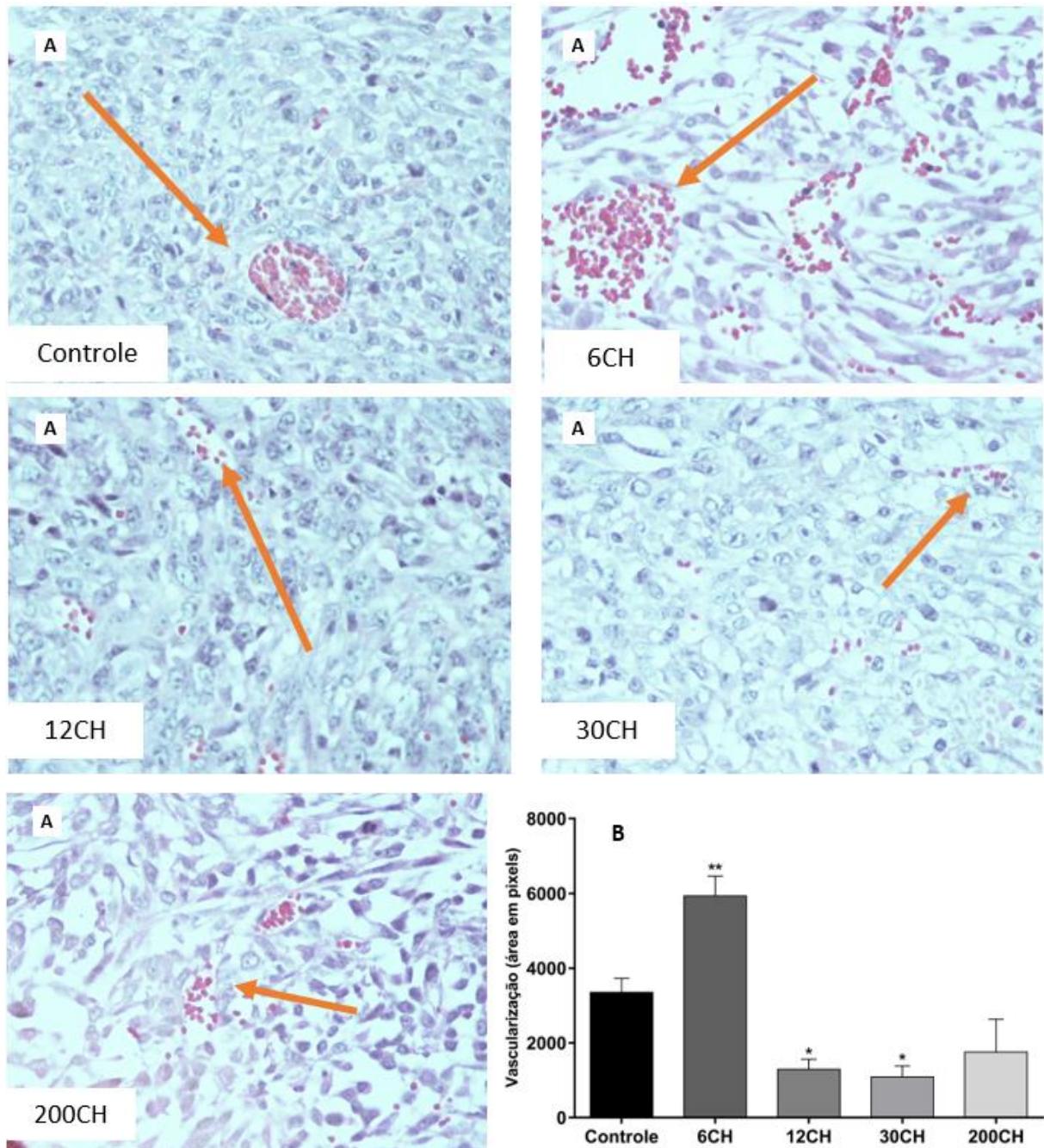
**Figura 6. Análises de pulmao: determinação de áreas de hemorragia/congestão.** A: Fotomicrografias representativas de cortes de pulmão representando áreas de congestão e/ou hemorragia (setas) em pixels, em camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 e tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH), respectivamente do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Lâminas de pulmão coradas com hematoxilina-eosina foram fotografadas em aumento de 40x e as imagens analisadas no Metamorph®. B: Gráfico correspondente às medidas das áreas de hemorragia/congestão em pixels. Colunas representam valor médio das medidas das áreas de hemorragia/congestão em pixels em cada grupo de tratamento. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$ , Anova uma via.

### 5.5.3. Vascularização

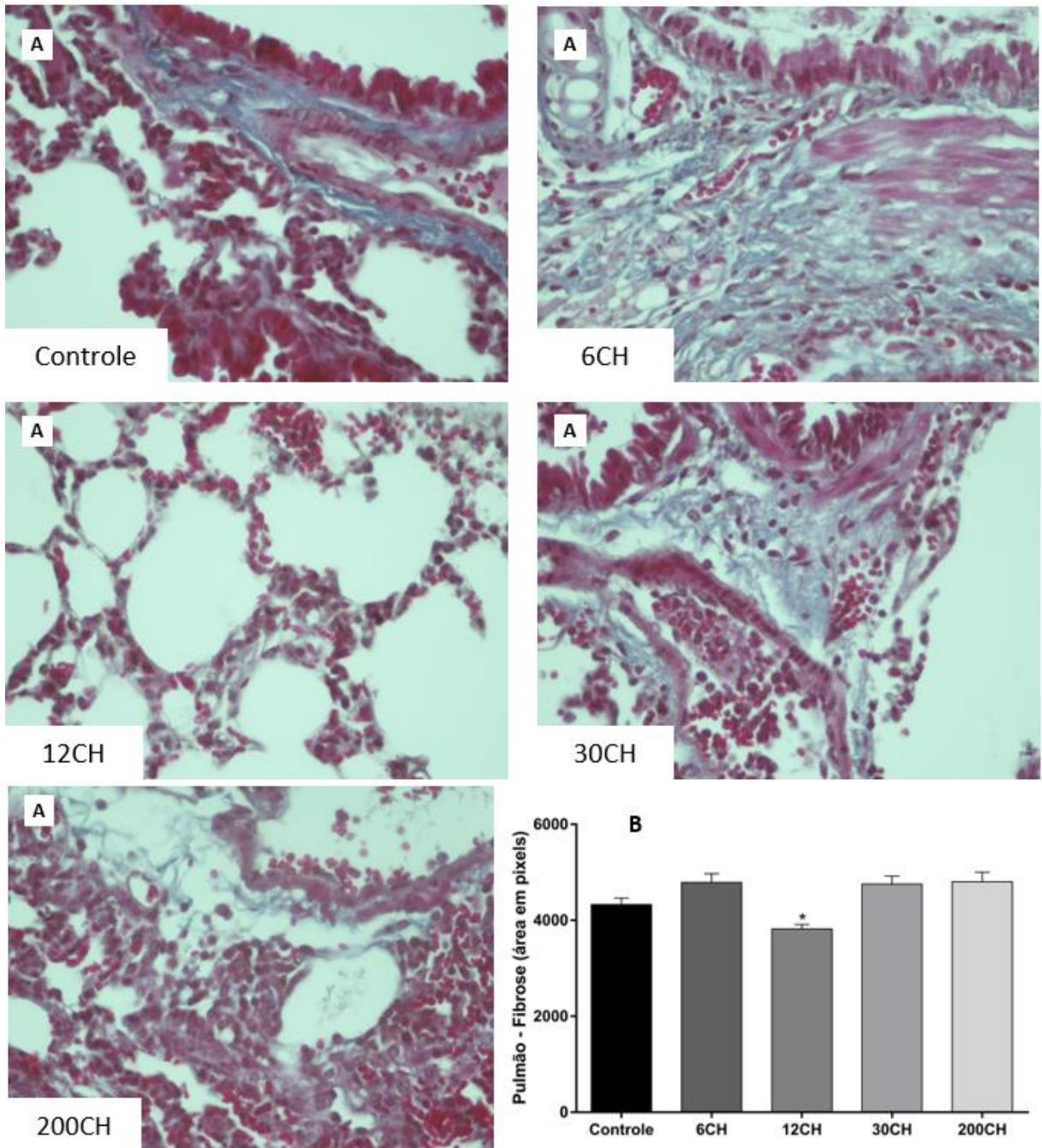
Vascularização em fotomicrografias de lâminas de tumor foram analisadas pelo software ImageJ® para determinação das áreas de vaso, pela presença de hemácias (Figura 7) nos grupos tratados com controle (veículo dinamizado) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH). Análises das áreas de vascularização em pixels de cada grupo demonstraram que animais tratados com as potências 12CH e 30CH apresentaram menor área quando comparados com o controle. Em contraste, animais tratados com a potência 6CH, quando comparados aos animais do grupo controle apresentaram maior área de vascularização (Figura 7 e Tabela 3).

### 5.5.4. Fibrose no pulmão.

Fotomicrografias de lâminas de pulmão (Figura 8) coradas com Tricrômico de Masson foram analisadas pelo software Metamorph® para determinação da área em pixels de fibrose nos grupos tratados com controle (veículo dinamizado) ou com *Phytolacca decandra* nas potências 6CH, 12CH, 30CH ou 200CH. Análises dos dados obtidos demonstram que animais tratados com a potência 12CH apresentaram menor área de fibrose quando comparados com o controle (Figura 8, Tabela 3).



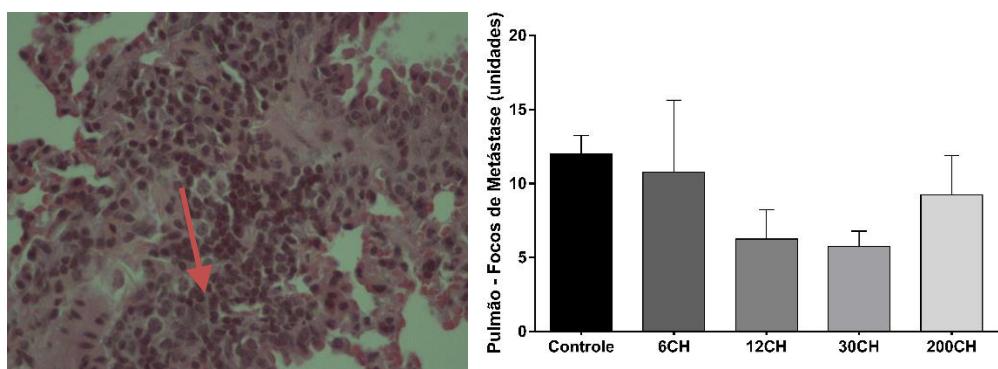
**Figura 7. Áreas de vascularização presentes no microambiente tumoral.** A: Fotomicrografias representativas de cortes de tumor mostrando a presença de vasos (setas) em lâminas contendo tumores de camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 e tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH), respectivamente do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina, fotografadas em aumento de 40x e as imagens analisadas no Metamorph®. B: Colunas no gráfico representam o valor médio das áreas de vascularização em pixels em cada grupo de tratamento. \* p < 0,05 e \*\*p < 0,001, Anova uma via.



**Figura 8. Análises de pulmão: determinação de áreas de fibrose.** A: Fotomicrografias representativas de cortes de pulmão representando áreas de fibrose (setas) em pixels, em camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 e tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH), respectivamente do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Lâminas de pulmão coradas com hematoxilina-eosina foram fotografadas em aumento de 40x e as imagens analisadas no Metamorph®. B: Gráfico correspondente às medidas das áreas de fibrose em pixels. Colunas representam valor médio das medidas das áreas de fibrose em pixels em cada grupo de tratamento. \*  $p < 0,05$ . Kruskall Wallis.

### 5.5.5. Focos de metástase no pulmão

Para avaliação de focos de metástases, lâminas de cortes de pulmão foram avaliadas em aumento de 40x diretamente no microscópio. Para verificar que eram realmente áreas de metástase, as áreas com células indiferenciadas foram confirmadas em aumento de 100x por imersão (Figura 9). A contagem foi feita utilizando o aplicativo “*Manual Blood Cell Counter*” da *Apple Store*®. Análises do número de focos de metástases no pulmão não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos analisados apesar de demonstrar uma tendência de redução nos grupos tratados com as potências 12CH e 30CH (Figura 9 e Tabela 3).



**Figura 9. Identificação de focos de metástases no pulmão.** A, Fotomicrografia representativa de foco metastático em corte de pulmão (seta), em aumento de 40X.B, Gráfico representando o número de focos metastáticos no pulmão em camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 de forma subcutânea na mama inguinal esquerda, tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH, 200CH) do dia da inoculação até o dia da eutanásia. O pulmão foi retirado durante necropsia e lâminas de cortes de pulmão foram coradas com hematoxilina eosina e analisadas em fotomicroscópio em aumento de 40x. Focos de metástase foram contados utilizando o aplicativo “*Manual BloodCellCounter*” da *Apple Store*®. Colunas representam valor médio do número de focos metastáticos pulmonares em cada grupo de tratamento por unidades contadas. Sem diferenças estatísticas entre os grupos, Anova uma via.

## 5.6. Imunohistoquímica

### 5.6.1. Caspase-3

Fotomicrografias de lâminas de cortes tumorais coradas para o marcador caspase-3 (Figura 10) foram analisadas pelo software ImageJ®. Análises das áreas em pixels das regiões positivas dos animais tratados com a potência 6CH revelaram aumento significativo do marcador caspase-3 quando comparado com o grupo

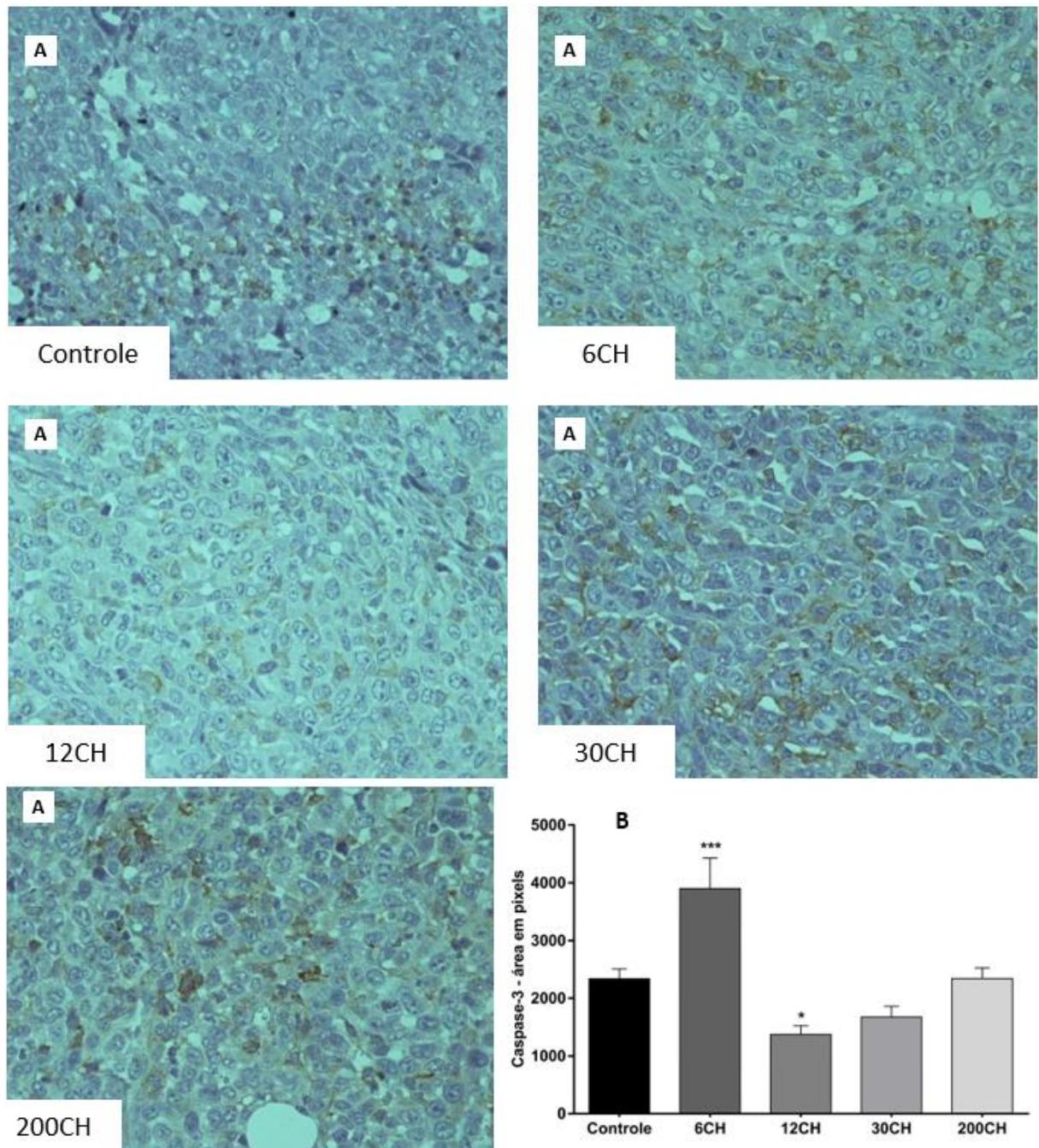
controle. Em contraste, animais tratados com a potência 12CH apresentaram uma área menor de marcação em relação ao controle (Figura 10, Tabela 3).

#### 5.6.2. c-erbB-2

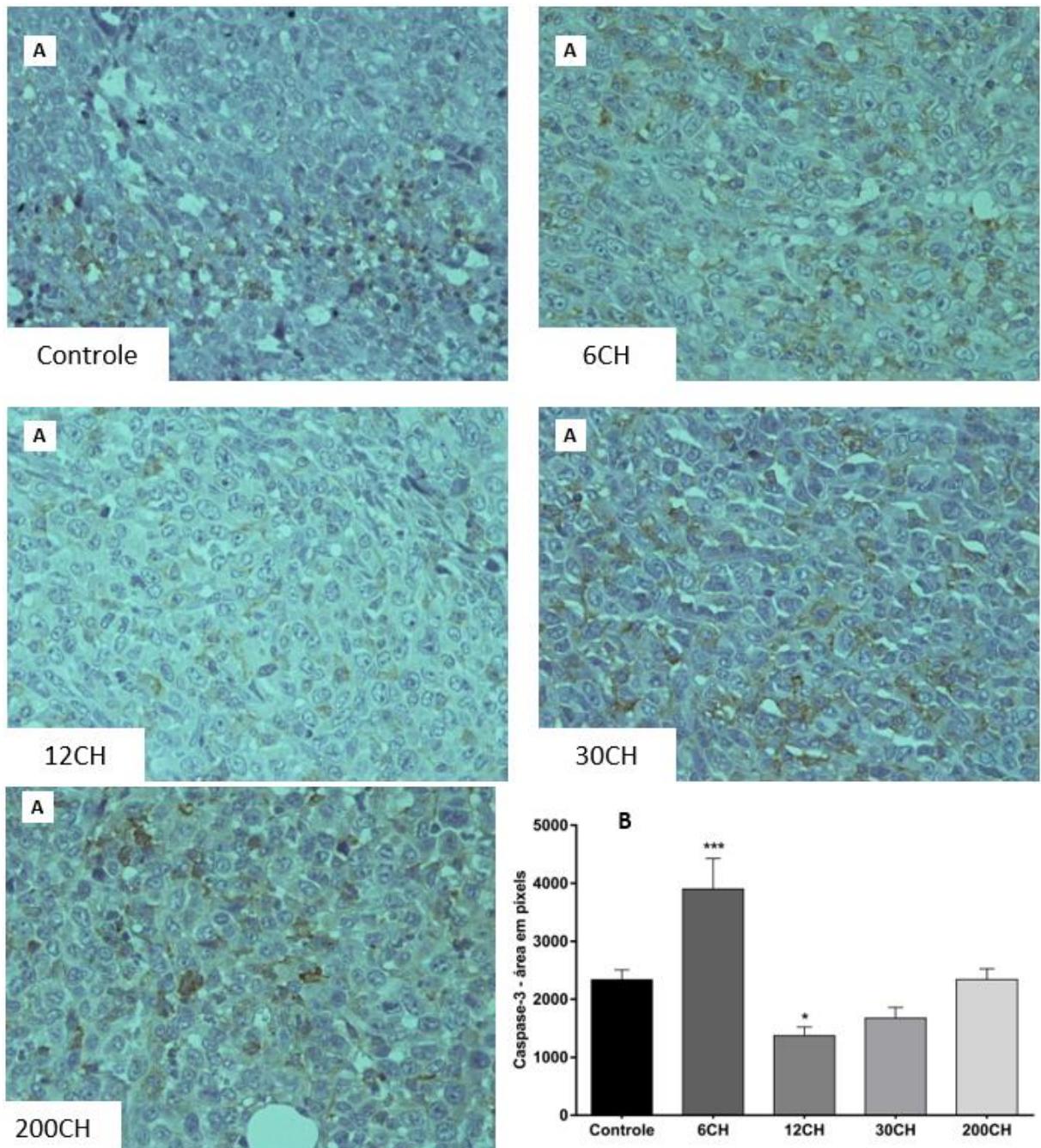
Fotomicrografias de lâminas de tumor positivas para o marcador c-erbB-2 (Figura 11) foram analisadas pelo *software* ImageJ® para determinar o número de marcações das regiões coradas nos grupos avaliados. Análises dos resultados obtidos demonstram que animais tratados com a potência 12CH apresentam maior número de células positivas quando comparados com os animais do grupo controle (Figura 11 e Tabela 3).

#### 5.6.3. p53 mutante

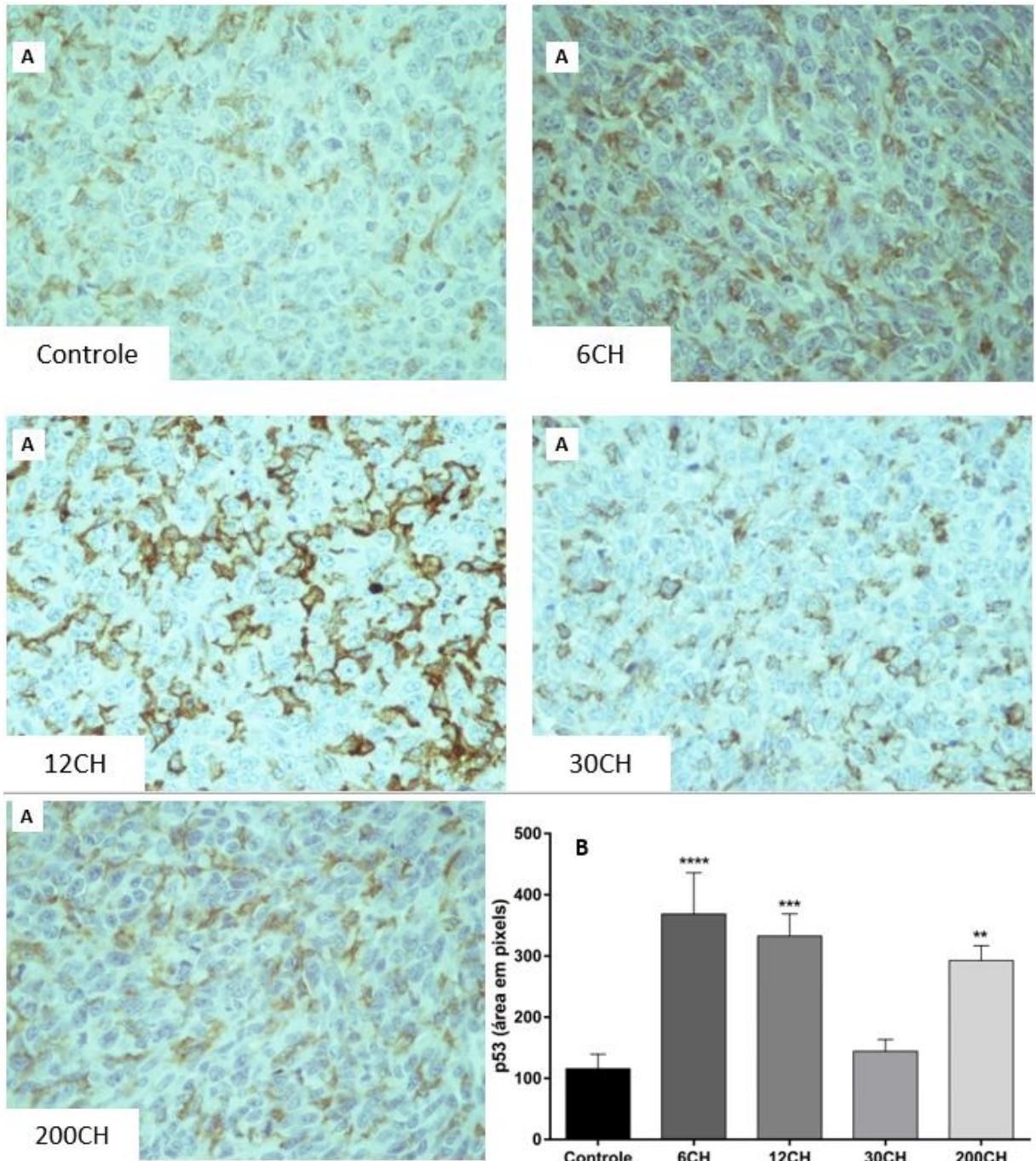
Fotomicrografias das lâminas de cortes de tumor positivas para o marcador p53 (Figuras 12) foram analisadas pelo *software* ImageJ®, utilizando a ferramenta IHC Toolbar para avaliar a intensidade das marcações e o *threshold* para avaliar as áreas marcadas. Análise das áreas em pixels das regiões positivas dos grupos tratados com *Phytolacca decandra* nas potências 6CH, 12CH, 30CH e 200CH, quando comparadas com o grupo controle (veículo dinamizado) não apresentaram diferenças significativas da marcação de p53 mutante em relação à área marcada (Figura 12). Entretanto, nas análises da intensidade da marcação do p53 mutante, animais tratados com a potência 6CH apresentaram maior intensidade (coloração mais intensa, no gráfico mais próximo ao 0) em relação aos animais do grupo controle (Figura 13).



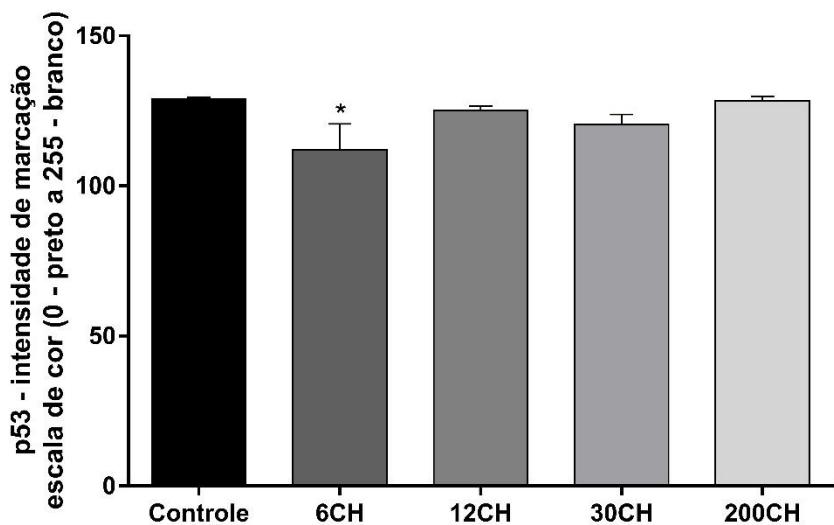
**Figura 10. Avaliação da expressão de caspase-3 nas células presentes no microambiente tumoral.** A.: fotomicrografias representativas de lâminas de cortes de tumor. Áreas em marrom positivas para caspase-3 em aumento 40X. Lâminas correspondentes a cortes de tumor em camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 de forma subcutânea na mama inguinal esquerda e tratados *ad libitum* com veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH), do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Lâminas de cortes do tumor foram submetidas a ensaios imunohistoquímicos para marcação de caspase-3 e analisadas no software ImageJ® para determinação das áreas positivas para o marcador. B: Colunas representam o valor médio das áreas em pixels positivas para a marcação de caspase-3 por grupo de tratamento. \* p < 0,05 e \*\*\* p < 0,001, Anova uma via.



**Figura 11. Avaliação da expressão de c-erbB2 na membrana das células presentes no microambiente tumoral.** A: fotomicrografias representativas de lâminas de cortes de tumor. Áreas em marrom positivas para c-erbB2 em aumento 40X. Lâminas correspondentes a cortes de tumor em camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 de forma subcutânea na mama inguinal esquerda e tratados *ad libitum* com veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH), do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Lâminas de cortes do tumor foram submetidas a ensaios imunohistoquímicos para marcação de c-erbB2 e analisadas no software ImageJ® para determinação das áreas positivas para o marcador. B: Colunas representam o valor médio do número de células positivas para c-erbB2 por grupo de tratamento. \*\* p < 0,001, Anova uma via.



**Figura 12. Avaliação da expressão de p53 mutante nas células presentes no microambiente tumoral.** A: fotomicrografias representativas de lâminas de cortes de tumor com áreas em marrom positivas para p53 mutante em aumento 40X. Lâminas correspondentes a cortes de tumor de camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 de forma subcutânea na mama inguinal esquerda e tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH), do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Lâminas de cortes do tumor foram submetidas a ensaios imunohistoquímicos para marcação de p53 mutante e analisadas no software ImageJ®- threshold para determinação das áreas positivas para o marcador. B: Colunas representam o valor médio das áreas marcadas em pixels por grupo de tratamento. Sem diferença estatisticamente significante nos grupos analisados. Anova uma via.



**Figura 13. Intensidade de expressão de p53 nas células presentes no microambiente tumoral.** Camundongos BALB/c inoculados com  $2 \times 10^4$  células de adenocarcinoma mamário 4T1 de forma subcutânea na mama inguinal esquerda e tratados *ad libitum* com o veículo dinamizado (controle) ou com potências de *Phytolacca decandra* (6CH, 12CH, 30CH ou 200CH), respectivamente do dia da inoculação até o dia da eutanásia. Lâminas de cortes do tumor foram submetidas à marcação para p53 mutante e após reação de imunohistoquímica áreas positivas foram analisadas no software ImageJ - *IHC toolbar* para determinação da intensidade da marcação. As marcações coradas com DAB são convertidas automaticamente pelo software em tons de cinza e a média ponderada da intensidade das marcações calculada em uma escala de 0 a 255, onde 0 é totalmente preto e 255 é branco (As estruturas não coradas por DAB são consideradas como branco pelo software). Colunas representam o valor médio da intensidade do marcador p53 em pixels por grupo de tratamento. \*  $p < 0,05$ . Anova uma via.

Para melhor visualização do conjunto de resultados apresentados no presente trabalho, a Tabela 3 resume os dados obtidos em cada uma das avaliações realizadas no trabalho.

**Tabela 3. Efeitos das potências de *Phytolacca decandra* no desenvolvimento do adenocarcinoma mamário.** Médias e erro padrão dos resultados dos ensaios realizados em animais inoculados com células de adenocarcinoma mamário, tratados *ad libitum* na água de bebida com o veículo dinamizado (controle) ou com *Phytolacca decandra* nas potências 6CH, 12CH, 30CH ou 200CH. Análises p53 mutante em relação à quantidade de marcação (QM) e intensidade da marcação (IM). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . Anova. Setas indicam tendências em relação ao grupo controle, g = peso em gramas, p = área em pixels, u = unidades contadas, c = intensidade de marcação em escala de cinza (0 preto - 255 branco).

Marcador	Controle	6CH	12CH	30CH	200CH
<b>Peso tumor (g)</b>	$0,541 \pm 0,048$	$0,351 \pm 0,098$ ↓↓	$0,340 \pm 0,051$ ↓↓	$0,273 \pm 0,087$ *	$0,590 \pm 0,061$ ↑
<b>Peso relativo baço (g)</b>	$0,312 \pm 0,032$	$0,326 \pm 0,067$ =	$0,215 \pm 0,018$ ↓	$0,159 \pm 0,038$ *	$0,265 \pm 0,015$ ↓
<b>Razão PB/PV</b>	$9,514 \pm 1,163$	$14,250 \pm 3,373$ ↑↑	$10,290 \pm 1,323$ ↑	$8,404 \pm 1,323$ ↓	$34,05 \pm 8,774$ *** ↑↑↑
<b>Congestão / Hemorragia (p)</b>	$25,73 \pm 3,754$	$19,86 \pm 1,849$ ↓↓	$15,07 \pm 3,217$ *	$18,24 \pm 1,605$ ↓↓	$12,69 \pm 0,710$ ** ↓↓↓
<b>Vascularização (p)</b>	$3349 \pm 378,2$	$5932 \pm 530,3$ ** ↑↑↑	$1297 \pm 262,5$ *	$1092 \pm 294$ *	$1754 \pm 881,6$ ↓↓↓
<b>Focos Metástase (u)</b>	$12 \pm 1,225$	$10,75 \pm 4,87$ ↓	$6,25 \pm 1,974$ ↓↓	$5,75 \pm 1,031$ ↓↓	$9,25 \pm 2,626$ ↓
<b>Fibrose (p)</b>	$4330 \pm 131,4$	$4789 \pm 181$ ↑	$3820 \pm 89,66$ *	$4754 \pm 164,8$ ↑	$4805 \pm 199,9$ ↑
<b>Caspase-3 (p)</b>	$2338 \pm 170,3$	$3899 \pm 528,4$ *** ↑↑	$1375 \pm 148,8,3$ * ↓↓	$1678 \pm 184,1$ ↓	$2343 \pm 183,2$ =
<b>c-Herb-2 (u)</b>	$4,523 \pm 1,655$	$8,108 \pm 2,677$ ↑↑	$13,98 \pm 1,247$ ** ↑↑↑	$7,844 \pm 2,057$ ↑↑	$7,179 \pm 2,361$ ↑↑
<b>p53 IM (c)</b>	$129 \pm 0,588$	$112,2 \pm 8,451$ * ↑↑	$125,2 \pm 1,467$ =	$120,5 \pm 3,385$ ↑	$128,3 \pm 1,550$ =
<b>p53 QM (p)</b>	$115,6 \pm 24,13$	$368,4 \pm 67,18$ ↑↑	$332,2 \pm 36,71$ ↑↑	$114,1 \pm 19,5$ =	$292,4 \pm 24,56$ ↑

## 6. DISCUSSÃO

O uso de terapias alternativas e complementares, como a homeopatia, está em crescimento (SAGHATCHIAN *et al.*, 2014), porém apesar de bem difundida, ainda se questiona o valor dessa prática (PATTERSON, 2002). A elucidação de mecanismos moleculares envolvidos nos processos tumorais é o maior foco dos pesquisadores em câncer (FANTOZZI & CHRISTOFORI, 2006). Por isso, vários modelos de estudo utilizando medicamentos homeopáticos estão sendo desenvolvidos para contribuir na discussão sobre a eficácia desses medicamentos no tratamento de doenças específicas (RAMACHANDRAN *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que camundongos com tumor de mama e tratados com potências de *Phytolacca decandra* exibem diversos tipos de repostas em cada parâmetro analisado. Assim, o tratamento com a potência 30CH apresentou retardo tanto no início do crescimento como no volume e peso do tumor quando comparado com o controle (Figura 2 e 3).

Considerando que o baço atua como filtro para patógenos e抗ígenos sanguíneos, sabe-se que funções imunes e hematopoiéticas têm sido reveladas no baço de camundongos (BRONTE & PITTEL, 2013). Assim, a esplenomegalia (aumento do tamanho do baço) é uma condição comum em situações como infecções e câncer, sugerindo que a diferença de tamanho encontrada pode estar relacionada com a modulação imunológica já identificada como mecanismo de ação de medicamentos homeopáticos por vários autores (REMYA *et al.*, 2014; BONAMIN *et al.*, 2012; RAMACHANDRAN *et al.*, 2007). Resultados obtidos aqui mostram que animais tratados com a potência 30CH apresentaram menor tamanho do baço (Figura 4). Uma possível hipótese deste resultado seria que esse controle imunológico ficou restrito aos linfonodos, órgão linfoide secundário que favorece o início da resposta imune adaptativa (ABBAS, 2011) também denominado de linfonodo sentinela e primeiro a receber a drenagem linfática tumoral (QUADROS & GEBRIM, 2007), não sendo disparada a resposta sistêmica nos animais tratados com o 30CH.

A função principal da polpa vermelha é filtrar o sangue e reciclar o ferro de células vermelhas envelhecidas. A polpa branca é estruturalmente similar ao linfonodo, pois contém células T e B permitindo a geração de抗ígenos específicos e resposta imune que protege o organismo. O baço é o local onde respostas

imunitárias sistêmicas contra o que é prejudicial ao hospedeiro podem ser reguladas (BRONTE & PITTEL, 2013). O aumento da razão entre polpa branca e polpa vermelha nos camundongos tratados com a potência 200CH, sugere maior atividade linfoide sistêmica nesse grupo, que pode estar relacionada à resposta tumoral a抗ígenos solúveis. Entretanto, diferente do esperado nas avaliações do crescimento tumoral e peso relativo do baço essa potência não apresentou diferenças em relação ao controle.

Os camundongos tratados com a potência 12CH e 200CH apresentaram redução na hemorragia/congestão no pulmão (Figura 6) e o grupo 12CH apresentou também menor fibrose (Figura 8). As áreas de fibrose estão relacionadas com área de cicatrização, sendo esperado que o grupo tratado com a 12CH tenha menor fibrose por ter menor lesão, verificada por área de hemorragia/congestão. Não foi possível verificar essa relação fibrose/hemorragia no grupo tratado com a potência 200CH. Quanto aos focos de metástase, que também poderiam auxiliar na correlação desses resultados nas lâminas de pulmão, todos os grupos apresentaram menor quantidade de focos que o controle, porém não foi estatisticamente significante, provavelmente por ser uma amostra pequena característica de um teste piloto (utilizado os 3Rs no trabalho - *reduction, replacement and refinement*; conforme o Guia Brasileira de Boas Práticas para Eutanásia em Animais do Conselho Federal de Medicina Veterinária). Há uma tendência interessante a menor metástase nos grupos tratados com 12CH e 30CH de quase metade do valor de focos encontrado que no grupo controle (tabela 3).

Para manter o crescimento e persistência de tumores sólidos primários a vascularização é uma adaptação fundamental no tecido tumoral para garantir a nutrição das células. Sua presença está correlacionada a um mau prognóstico e maior risco de formação de metástases em vários tipos de câncer, incluindo o de mama (FANTOZZI & CHRISTOFORI, 2006). Neste trabalho, foi analisada a vascularização considerando a presença de hemácias nas lâminas de tumor. Resultados apresentados na Figura 7 demonstraram menor vascularização nos animais tratados com as potências 12CH e 30CH. O tratamento com a potência 6CH apresentou maior vascularização quando comparado com o grupo controle, e também expressão estatisticamente significante maior de caspase-3. As caspases são proteases, que participam da cascata de sinalização de morte celular e são as principais efetoras do processo de apoptose (MARTI *et al.*, 2000, ZUCCARI *et al.*,

2008). Apesar do resultado da vascularização sugerir que esse tumor está em atividade de replicação, a presença de alta expressão de caspase-3 nesse grupo sugere que as células estão em processo de morte celular, o que justifica o peso do tumor do grupo 6CH ser menor do que o controle.

A caspase-3 vem sendo foco de estudos relacionados ao mecanismo de morte celular, uma vez que é ativada em resposta a vários estímulos como drogas quimioterápicas. A marcação de caspase-3 pode ser utilizada no controle da resposta aos tratamentos quimioterápicos, quanto a possível resistência da droga e a diminuição de sua expressão indica um mecanismo importante de sobrevivência da célula tumoral em pacientes com câncer de mama (ZUCCARI *et al.*, 2008). Neste modelo de estudo, essa expressão foi variável entre os grupos, sendo encontrada em maior ou menor concentração de acordo com a potência de tratamento, conforme pode ser verificado na Tabela 3. O aumento da expressão de caspase-3 já foi verificado em trabalho com *Viscum álbum* em tratamento com baixa diluição (CARVALHO, 2015). Comparando com o controle, há uma maior expressão de caspase-3 no grupo tratado com a potência 6CH e menor expressão no grupo tratado com a 12CH.

Com o intuito de melhor caracterizar a ação das dinamizações de *Phytolacca decandra* aqui testadas, além da análise de caspase-3, as lâminas do tumor foram submetidas a outras análises de imunohistoquímicas com os marcadores: c-erbB-2 e p53 mutante. A identificação de marcadores pode auxiliar a predizer o comportamento de tumores e seu prognóstico (EISENBERG & KOIFMAN, 2001) sendo que os marcadores c-erbB-2 e o p53 mutante estão entre os principais marcadores tumorais utilizados no câncer de mama e podem dar indícios de prognóstico da doença (EISENBERG & KOIFMAN, 2001, ALMEIDA *et al.*, 2007).

O oncogene c-erbB-2, também denominado Her-2 ou oncogene *neu*, é um marcador de membrana que aparece aumentado em cerca de 20 a 40% dos tumores de mama, e está associado com pior prognóstico e falta de resposta a determinadas drogas antitumorais alterando a quimiossensibilidade do tumor à quimioterapia citotóxica (SILVA *et al.*, 2002, ALMEIDA *et al.*, 2007, ZUCCARI *et al.*, 2008). Esse mau prognóstico é devido ao aumento da atividade metastática encontrada nos tumores que expressam esse marcador, e diminuição da sobrevida do paciente (EISENBERG & KOIFMAN, 2001, ALMEIDA *et al.*, 2007). Todos os grupos tratados com *Phytolacca decandra* tiveram maior expressão de c-erbB-2 do

que o grupo controle, e o aumento no grupo tratado com 12CH foi estatisticamente significante. Como esse aumento não se relacionou ao aumento do tamanho do tumor, provavelmente está relacionado com a característica patogenética do medicamento homeopático. Se confirmada por outros estudos essa característica do tratamento com a potência 12CH, ela pode ser uma estratégia como medicamento adjuvante na terapia monoclonal.

O gene supressor de tumor p53 tem potente atividade supressora tumoral e é amplamente aceito como alvo molecular (ZILFOU & LOWE, 2009). Esse agente desempenha um importante papel no controle do ciclo celular e previne o aparecimento do câncer. Em células que já sofreram a injúria no DNA, o p53 bloqueia a divisão celular para permitir o reparo e, quando o reparo não funciona, dispara a cascata do processo de apoptose. Esse gene regulador tem meia vida curta e normalmente não é visualizado em marcações imunohistoquímicas (EISENBERG & KOIFMAN, 2001, ALMEIDA *et al.*, 2007, ZUCCARI *et al.*, 2008). Uma mutação do gene p53 causa a perda dessa proteção celular, desestabiliza o genoma e permite a produção de uma proteína p53 defeituosa que se acumula na célula e é eliminada mais vagarosamente, permitindo sua detecção pela técnica da imunohistoquímica (ZUCCARI *et al.*, 2008). Vários investigadores estão sugerindo valores prognósticos para expressão aumentada de p53 em humanos, entretanto os resultados são conflitantes e é difícil comparar os resultados obtidos pela grande variedade de metodologias utilizadas (EISENBERG & KOIFMAN, 2001). O padrão de marcação para p53 é nuclear e sua expressão pode ser avaliada em relação à intensidade da coloração e à proporção de células coradas (ZUCCARI *et al.*, 2008). Com base nessas informações, foram analisados tanto a intensidade como a área de marcação do p53. Foi encontrado um aumento do p53 no grupo 6CH quando avaliada a intensidade de marcação, e não foi verificada diferença estatística entre os grupos quando avaliada áreas de marcações.

Apesar de alguns estudos relacionarem a existência de uma associação entre a amplificação do oncogene c-erbB-2 e o acúmulo da proteína p53 no pior prognóstico (EISENBERG & KOIFMAN, 2001, ZUCCARI *et al.*, 2008), não foi possível verificar essa relação com os resultados clínicos obtidos, sugerindo que os medicamentos homeopáticos estão atuando por outra via.

Ao fazer uma conjectura sobre os resultados obtidos, ao extrapolarmos os resultados para a prática clínica e considerando que as pesquisas com

medicamentos homeopáticos são translacionais, podemos considerar que estudos como esse podem ser interessantes para elaboração de um programa preventivo ou de tratamento conjunto com outras terapias, principalmente se considerarmos as características gerais do medicamento homeopático, de baixo custo, sem risco de intoxicação e melhoria da qualidade de vida já vistos em outros estudos.

## 7. CONCLUSÃO

Estes resultados demonstram que diferentes diluições do mesmo medicamento possuem ações não lineares, ao contrário da crença popular de que o medicamento mais alto é mais forte, e informação importante do ponto de vista da prática clínica. Foi constatado que o tratamento com a potência 30CH apresentou o melhor desfecho, tendo um retardo no crescimento do tumor e também menor tumor após necropsia, os animais tiveram um aumento de peso, importante quando se avalia qualidade de vida do paciente com câncer, menor vascularização, menor número de focos de metástase no pulmão e menor peso relativo do baço, sugerindo que o tumor desse grupo de tratamento ficou mais restrito que os demais grupos.

Trata-se de um estudo piloto que permite a definição inédita de dois parâmetros importantes a serem considerados: a) a melhor potência homeopática para obtenção de melhor desfecho clínico = 30CH e, b) a possibilidade de se usar potências baixas 6 e 12CH como pré-tratamento para potencializar a eficiência de tratamentos tradicionais com anti-Her2 em pacientes com câncer de mama.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. 7<sup>a</sup>. ed. p. 389-405. Elsevier. São Paulo, 2011.
- ADAMI, H.O., DAY, N.E., TRICHOPOULOS, D., WILLET, W.C. Primary and secundary prevention in the reduction of cancer morbidity and mortality. **Eur J Cancer**. v.37. p. 118-127, 2001.
- ADLER, U. C.; AMBROSIO, E. ANELLI, M.; CAPPELLO, E.; DE TOLEDO CESAR, E; GUIMARÃES, E. C. A strict definition of homeopathy according to Hahnemann. **British Homeopathic Journal**, v. 85, p. 79-82, 1996
- ALMEIDA, J.R.C., PEDROSA, N.L., LEITE, J.B., FLEMING, T.R.P, CARVALHO, V.H., CARDOSO, A.A.A. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. V. 53. pg. 305 – 316, 2007.
- BANERJI, P., CAMPBELL, D. R., BANERJI, P. Cancer patients treated with the Banerji protocols utilising homoeopathic medicine: A Best Case Series Program of the National Cancer Institute USA. **Oncology Reports**. v. 20, p. 69-74, 2008
- BELL, I. R., SARTER, B., KOITHAN M., BANERJI, P., JAIN, S., IVES, J. Integrative Nanomedicine: Treating cancer with nanoscale natural products. Global advances in health and medicine journal. v. 3, p. 36 – 53, 2014.
- BHATTACHARJEE, N., PATHAK, S., KHUDA-BUKHSH, A. R. 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, E., LUCERI, C., BERNARDINI, S., DEI, A., FILIPPINI, A., DOLARA, P. Exploring the effects of homeopathic *Apis mellifica* preparations on human gene expression profiles. **Homeopathy**, v. 103, p. 127 – 132; 2014.
- BISWAS, S. J., PATHAK, S., BHATTACHARJEE, N., KUMAR, J., KHUDA-BUKHSH, A.R., 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, L. V.; SATO, C.; NETO, R. Z.; MORANTE, G.; CARDOSO, T. N.; SANTANA, F. R.; COELHO, C. P.; OSUGUI, L.; POPI, A. F.; HURTADO, E.C.P.; MARIANO M. Imunomodulation of Homeopathic Thymulin 5CH in a BCG-Induced Granuloma Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative medicine**, v. 2013, 15 pages, 2012.
- BONAMIN, L. V. Signals and Images. Contributions And Contradictions about Hight Dilution Research. **Springer** .1<sup>a</sup>. ed. v.1. p. 3-22, 2008.

BONAMIN, L.V.; ENDLER, P. C. Animal models for studying homeopathy and high dilutions: Conceptual critical review. **Homeopathy**, v.99. p. 37 – 50; 2010.

BONAMIN, L.V., CARDOSO, T. N., CARVALHO, A.C., AMARAL, J. G. The use of animal models in homeopathic research – a review of 2010 – 2014 PubMed indexed papers. **Homeopathy**, v. 104, p. 283 – 291, 2015.

BRAGHIROLI, A. M. S. **Produção de I-124 com uso de nanomateriais e sua biodistribuição em animais**. 2014. 21f. Dissertação (Doutorado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2014.

BRASIL a, Ministério da Saúde - INCA – Instituto Nacional do Câncer. Câncer de mama. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 14/02/2016. 12:50:54.

BRASIL b, Ministério da Saúde - INCA – Instituto Nacional do Câncer. Câncer de mama, Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/outubro-rosa/2015/cancer-de-mama.asp>>. Acesso em: 14/02/2016. 12:55:32.

BRASIL ,Farmacopéia Homeopática Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 3<sup>a</sup> edição, 2011. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a\\_edicao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf) Acesso em: 11/04/2016.

BRODIE, K. J.; **The efficacy of *Phytolacca decandra* 15CH in the treatment of fibroadenoma of the breast in pre-menopausal females**. Universityof Johannesburg, complete dissertation, 2002. Disponível em: <https://ujdigispace.uj.ac.za/handle/10210/9046> Acesso em 14/02/2106. 18:50:01.

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

CAIRO, N. "Guia de Medicina Homeopática"; **Editora Teixeira**, 21a. edição, v.1. p. 515-516, 1984.

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

CARVALHO, A. C. **“Atividade anti-neoplásica de *Viscum album* (L) em tumores experimentais: Revisão crítica e estudo experimental em tumor de Ehrlich”**. Universidade Paulista. Tese completa, 2015. Disponível em: [http://www.unip.br/ensino/pos\\_graduacao/strictosensu/med\\_veterinaria/ss\\_med\\_veterinaria\\_teses2015.aspx](http://www.unip.br/ensino/pos_graduacao/strictosensu/med_veterinaria/ss_med_veterinaria_teses2015.aspx), consulta em: 19/04/2016 21:31:55

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia de Boas Práticas para Eutanásia em Animais – Conceitos e procedimentos recomendados**. Volume 1 , Brasilia, 2012. Disponível em:

<http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/Guia%20de%20Boas%20Pr%C3%A1ticas%20para%20Eutanásia.pdf.pdf>, consulta em> 19/04/2016 22:52:10

COUGHLIN, S.S., EKWUEME, D.U., Breastcancer as a global healthconcern. **Cancer Epidemiol.** v.35. p. 315 - 318, 2009.

DAS, S., DAS, J. SAMADDER A., BHATTACHARYYA, S.S., DAS, D., KHUDA-BUKHSH, A.R., Biosynthesized silver nanoparticles by ethanolic extracts of *Phytolacca decandra*, *Gelsemium sempervirens*, *Hydrastis canadensis* and *Thuja occidentalis* induce differential cytotoxicity through G2/M arrest in A375 cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 101, p. 325 – 336, 2013.

DAS, J., DAS, S., SAMADDER, A., BHADRA, K., KHUDA-BUKHSH, A. R. 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, J., DAS, S., PAUL, A., SAMADDER, A., KHUDA-BUKHSH, A. R. Strong Anticancer Potential of Nano-triterpenoid from *Phytolacca decandra* against A549 Adenocarcinoma via a Ca 2+-dependent Mitocondrial Apoptotic Pathway. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**. v. 7. p. 140 - 150, 2014.

DUPRE, S. A.; REDELMAN, D.; HUNTER JR. K.W. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumor foci. **Int. J. Exp. Path.**, v. 88. p. 351 – 360, 2007.

EISENBERG, A.L.A., KOIFMAN, S. Câncer de Mama: Marcadores Tumorais (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2001, v. 47, p. 377 – 399, 2001.

FANTOZZI, A., CHRISTOFORI, G., Mouse models of breast cancer metastasis. **Breast cancer research**, v. 8, p. 1 – 12, 2006.

FERRAZ, F. N.; SIMONI, G. K.; NASCIMENTO, A.; MELO, C. S.; ALEIXO, D. L.; GOMES, M. L.; SPACK, M.; DE ARAÚJO, S. M. Different forms of administration of biotherapy 7 DH in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* produce different effects. **Homeopathy**, v. 100 (4), p. 237-243, 2011.

FRASS, M., FRIEHS, H., THALLINGER, C., SOHAL, N. K., MAROSI, C., MUCHITSCH, I., GAERTNER, K., GLEISS, A., SCHUSTER, E., OBERBAUM, M. 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, M., MISHRA, B.M., SEN, S., YANG, P., PAWLUS, A., VENCE, L., LEBLANC, A., COHEN, L., BANERJI, P., BANERJI, P., Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells, **International Journal of Oncology**, v. 36, p. 395-403, 2010.

GAERTNER, K., MÜLLNER, M., FRIEHS, H., SCHSTER, E., MAROSI, C., MUCHITSCH, I., FRASS, M., KAYE, A.D. 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.

GARRITANO, C. R.O.; Avaliação do uso de extrato de Timo (Timulina) em pacientes com neoplasia maligna submetidos o tratamento cirúrgico. **Rev. Col Bras. Cir.** v. 34. p.225-231, 2007

GOMES M G, SILVA C M, RIBEIRO A F C, OCARINO N M, MORO L, VASCONCELOS, A C, SERAKIDES, R. Apopose, Proliferação e Histomorfometria do baço de ratas adultas com hipofunção tireoidiana e ovariana. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 52. p 1031 – 1038, 2008.

GOSH, S., BISHAYEE, K., PAUL, A., MUKHERJEE, A., SIKDAR, S., CHAKRABORTY, D., BOUJEDAINI, N., KHUDA-BUKHSH, A. R. "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.

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

JUNG, C., HONG, J., BAE, S.Y., KANG, S.S., PARK H.J., LEE, S.K. 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, p. 2983 – 2993, 2015.

KASSAB, S.; CUMMINGS, M.; BERKOVITZ, S.; VAN HASELEN, R.; FISHER, P. Homeopathic medicines for adverse effects of cancer treatments. **Cochrane Database Sys.** v. 2, p. 1465 - 1858, 2009.

KHUDA-BUKHSH, A. R. Mice as a model for homeopathy research. **Homeopathy.** v.98. p. 267 – 279; 2009.

KHUDA-BUKHSH, A. R. 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.

KHUDA-BUKHSH, A. R., BHATTACHARYYA, S. S., PAUL, S., DUTTA, S., BOUJEDAINI, N., BELON, P. Modulation of Signal Proteins: A plausible mechanism to explain how a potentized drug Secale cor 30C diluted beyond avogrado's limit combats skin papilloma in mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1 -12, 2011.

KOLEY, M., SAHA, S., GHOSH, S., NAG, G., KUNDU, M., MONDAL, R., PURKAIT, R., PATRA, S., SWAIF, S. Patient-Assessed Chronic Illness Care (PACIC) scenario in a Indian Homeopathic Hospital. **Journal of Traditional and Complementary Medicine.** v. 6, p. 72 – 77, 2016.

MALIEKAL, T. P. Antineoplastic effects of 4 homeopathic medicines. **British Homeopathic Journal**, v. 86, p. 99-91: 1997

MANESS, L., GOKTEPE, I., CHEN, H., AHMEDNA, M., SANG, S. Impact of Phytolacca Americana Extracts on Gene Expression of Colon Cancer Cells. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 219 – 223, 2013.

MARTI A, GRABER H, LAZAR H, RITTER PM, BALTZER A, SRINIVASAN A, *et al.* Caspases: decoders of apoptotic signals during mammary involution. Caspase activation during involution. **Adv Exp Med Biol.** v. 480, p. 195 -201; 2000.

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

PATTERSON, R. E., NEUHouser, M. L., HEDDERSON, M. M., SCHWARTZ, S. M., STANDISH, L. J., BOWEN, D. J., MARSHALL, L.M. Types of Alternative Medicine Used by Patients with Breast, Colon, or Prostate Cancer: Predictors, Motives, and Costs. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 8, p.477-485, 2002.

PILKINGTON, K.; KIRKWOOD, G.; RAMPES, H. Homeopathy for depression: a systemic review of the research evidence. **Homeopathy**, v. 94, p. 153-163, 2005.

PORTER, A. G. Flipping the safety catch of procaspase-3. **Nature Chemical Biology**. v.2, p. 509 – 510, 2006.

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

QUADROS, Luis Gerk de Azevedo; GEBRIM, Luiz Henrique. A pesquisa do linfonodo sentinel para o câncer de mama na prática clínica do ginecologista brasileiro. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 29, p. 158-164, 2007

RAMACHANDRAN, C., RAVEENDRAN NAIR, P.K., CLÈMENT, R.T., MELNICK, S.J. Investigation of cytokine expression in human leukocyte culture with two immune-modulatory homeopathic preparations. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.13, p. 403 – 407; 2007.

RASTOGI, D.P., Homeopatia na Índia: Educação, Atendimento e Pesquisa. **Revista de Homeopatia**. v. 72, p. 6 – 13, 2009.

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.

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

SAGHATCHIAN, M., BIHAN, C., CHENAILLER, C., MAZOUNI, C., DAUCHY, S., DELALOGE, S. Exploring frontiers: Use of complementary and alternative medicine among patients with early-stage breast cancer. **The Breast**. v. 23. p. 279 – 285; 2014.

SAHA, S., KOLEY, M., MAHONEY, E. R., HIBBARD J., GHOSH, S., NAG, G., PURKAIT, R., MONDAL, R., KUNDU, M., PATRA, S., ALI, S. S., ARYA, J. S., CHOUBEY, G. Patient activation measures in a government homeopathic hospital in India. **J Evid Based Complementary Altern Med**. v.19, p. 253-259, 2014.

SANTANA, F. R. “**Modulação da resposta inflamatória por preparações homeopáticas de Timulina e Antimonium crudum na leishmaniose experimental murina**”. Universidade Paulista. Dissertação completa, 2013. Disponível em: [https://www.unip.br/ensino/pos\\_graduacao/strictosensu/med\\_veterinaria/download/m\\_edvet\\_fabianarodriguesdesantana.pdf](https://www.unip.br/ensino/pos_graduacao/strictosensu/med_veterinaria/download/m_edvet_fabianarodriguesdesantana.pdf), consulta em: 19/02/2016 11:33:58

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.

SEARCY, R., REYES, O., GUAJARDO, G. Control of subclinical bovine mastitis: Utilization of a homoeopathic combination. **British Homeopathic Journal**, v.84, p. 67 – 70: 1995.

SHNEERSON, C.; TASKILA, T.; GALE, N.; GREENFIELD, S.; CHEN, Y.; 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.

SHU J., QIU G., ILYAS M., KAYE P. Biomarker Detection in Whole Slide Imaging based on Statistical Color Models. **The MIDAS Journal – Computational Imaging for tumor (CIBT)**, 2010. Disponível em <http://www.midasjournal.org/browse/publication/758>, consulta em 08/04/2016 às 12:00:28>.

SILVA, D. M., SADDI, V. A., MOMOTUK, E. G. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48. p.39-48: 2002.

SIQUEIRA, C. M.; COSTA, B.; AMORIM, A. M.; GONÇALVES, M.; VEIGA, V. F.; CASTELO-BRANCO, M.; TAKYIA, C.; ZANCAN, P.; CÂMARA, F. P.; COUCEIRO, J. N.; HOLANDINO, C. H3N2 homeopathic influenza virus solution modifies cellular and biochemical aspects of MDCK and J774G8 cell lines. **Homeopathy**, v. 102. p. 31-40, 2013.

SUNILA, E. S., KUTTAN, R., PREETHI, K.C., KUTTAN, G. Dynamized Preparations in Cell Culture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6. p. 257-263, 2009

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G.; PREETHI, K. C.; RAMADASAN, K. Effect of homeopathic medicines on transplanted tumors in mice. **Asian Pacific J Cancer Prev.**, v.8, p. 390-394, 2007.

TEIXEIRA, M. Z. Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar. **Rev. Med. São Paulo**. v. 85. p. 30-43, 2006.

THOMPSON E. A., MONTGOMERY A., REILLY D.D., AND REILLY D. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 11. p. 13-20, 2005

ULLMAN, D. 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.

VANNIER, L.; POIRIER, J.; Tratado de Matéria Médica Homeopática. **Organização Andrei Editora Ltda.**; 9a ed. v.1 p. 276-277, 1987.

VARSHNEY, J.P.; NARESH, R.; Evaluation of a homeopathic complex in the clinical management of udder diseases of riverine buffaloes. **Homeopathy**, v.93, p. 17-20, 2004.

VEER, L. J. V., WEIGELT, B. Road map to metastasis. **Nature**, v. 9. p. 999 – 1000: 2003

WEIGELT, B., JOHANNES L., VEER, P. VEER L. J. V. Breast Cancer Metastasis: Markers and Models. **Nature**, v. 5, p 591 - 602, 2005.

ZALLA NETO, R., RUSSO, R. T., MORANTE, G., DOS ANJOS, B., MARIANO, M. BONAMIN, L. V. 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

ZILFOU J. T. AND LOWE, S. W. Tumor supressive functions of p53. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v. 5, p 1- 28, 2009

ZUCCARI, D. A. P. C; BERTON, C. R.; TERZIAN, A.C.B; RUIZ, C.M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arq Ciênc Saúde**. v. 15, p. 189-98: 2008.

## Anexo 1. Certificado comitê de ética



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

**C E R T I F I C A D O**

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 283/15 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Estudo dos efeitos de preparações homeopáticas de Timulina e Phytolacca na evolução de adenocarcinoma mamaário em modelo murino.. 'ELIZABETH CRISTINA PEREZ HURTADO e LUCIANA NOGUEIRA, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 20 dias do mês de maio de 2015.

Hailey Barros F. Gonçalves  
Secretária do Comitê de Ética  
em Pesquisa da UNIP

## Anexo 2. Protocolos para macacões para imunohistoquímica, Laboratório APC



Título	Código	Página
IMUNOHISTOQUÍMICA	POP – APC -005	1 de

### IMUNOHISTOQUÍMICA

#### REAGENTES

Os reagentes são armazenados em local apropriado e conforme as especificações técnicas e compatibilidade química.

Água deionizada

Álcool 100%

Anticorpos primários monoclonais ou policlonais (conforme bulas)

Hematoxilina de Harris – Queel

Kit ENVISION FLEX da DAKO

Xilol

Meio de Montagem - Coversleeper

#### EQUIPAMENTOS

PT LINK – marca: DAKO

COVERSLEEPER – marca: DAKO



## REAÇÃO IMUNO- HISTOQUÍMICA – PROCEDIMENTO PASSO A PASSO

### Cortes

- Os blocos foram entregues à área de histotécnica após a triagem (identificação), e colocados no freezer para gelar;
- Após resfriamento do bloco, foram realizados cortes de 2 micras em micrótomo manual;
- Os cortes foram colocados em banho-maria à +/-65°C e “pescados” nas lâminas já identificadas com o número do caso;
- Essas lâminas foram colocadas em estufa à 60°C por 40 minutos para o início da desparafinização.

### Preparação

#### Período noturno:

- As lâminas foram colocadas em berços de coloração devidamente numeradas para serem distribuídas nos tanques dos ptLink (equipamento em comodato DAKO) e de acordo com o PH determinado.
- Fecharam-se os ptLink, fez-se a programação na tela do Menu de cada equipamento, verificou-se horário, dia da semana, temperatura e programação de início do processo.
- Finalmente foi verificado se o NO-BREAK estava ativo corretamente, a fim de garantirmos **o início do processo no período da manhã**.

### Processo da imunohistoquímica - Período da manhã

- O processo de desparafinização e re-hidratação das lâminas ocorrem nas máquinas ptLink com água deionizada e soluções prontas de ph baixo e ph alto que atingirão uma temperatura de aprox. 180°C num período de 72 minutos a partir das 4:00AM em soluções de phs ALTO e BAIXO.

- A continuidade do processo se dá com uso de todo o kit Envision Flex da Dako para a realização da reação imunohistoquímica, juntamente com uso de anticorpos concentrados (a serem diluídos) e *flex* (já diluídos) de acordo com seus respectivos ph's.

Vide protocolo resumido do uso do Kit Envision Flex, conforme figura abaixo:



Protocolo EnVision™ FLEX		Protocolo EnVision™ FLEX +	
Etapas	Tempo	Etapas	Tempo
1. EnVision™ FLEX Peroxidase Block	5 minutos	1. EnVision™ FLEX Peroxidase Block	5 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos	Solução de Lavagem	5 minutos
2. Anticorpo primário FLEX RTU	20 minutos	2. Anticorpo primário FLEX RTU	20 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos	Solução de Lavagem	5 minutos
3. EnVision™ FLEX /HRP	20 minutos	3. EnVision™ FLEX+ (Linker)	15 minutos
Solução de Lavagem	2 x 5 minutos	Solução de Lavagem	5 minutos
4. EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	2 x 5 minutos	4. EnVision™ FLEX /HRP	20 minutos
Solução de Lavagem		Solução de Lavagem	2 x 5 minutos
5. EnVision™ FLEX Hematoxilin	5 minutos	5. EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	2 x 5 minutos
Água destilada ou deionizada		6. EnVision™ FLEX Hematoxilin	5 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos	Solução de Lavagem	5 minutos
Água destilada ou deionizada		Água destilada ou deionizada	

Obs.: Quando realizados os dois protocolos simultaneamente, após a etapa 2 deixar as lâminas em solução de lavagem enquanto se incuba o "Linker" do protocolo EnVision™ FLEX +. Após isto, todas as etapas serão semelhantes para ambos os protocolos.

Caso necessite de Suporte Técnico, entre em contato através do fone:  
(11) 5070-8300

Abaixo segue também a descrição detalhada do processo resumido na figura 1:

- Abrir as tampas do PT LINK e deixar esfriar por 30 minutos para que não haja choque térmico nas lâminas.
  - Retirar os carrinhos do PTLINK;
  - Mergulhar 10 vezes em solução tampão e deixar descansar por 5 minutos.
- Trocar o tampão, repetir o procedimento e deixar mais 5 minutos em descanso;
- Retirar os carrinhos com as lâminas da solução, tirar dos carrinhos uma a uma, secar nos arredores do fragmento com campo cirúrgico, fazer um círculo com a caneta hidrofóbica DAKO PEN ao redor do fragmento delimitando-o, e distribuir as mesmas nas caixas acrílicas lado a lado. Em seguida pipeta-se 100ul de peroxidaseblock e deixar por 5 minutos em descanso;
- Em seguida lavar com solução tampão (WASH) as lâminas e deixar também por 5 minutos em descanso;
- Retirar o excesso de solução tampão, levantando uma lâmina por vez, devolver na caixa novamente para pipetar o anticorpo primário já diluído, conforme designado nas lâminas previamente etiquetadas. O processo de incubação os anticorpos devem seguir as instruções abaixo:

## INCUBAÇÃO COM ANTICORPO PRIMÁRIO

- ✓ Utilizamos anticorpos que já vem pré-diluídos (FLEX).
- ✓ Enxugaram-se as lâminas que estavam na água deionizada com campo cirúrgico ou papel toalha, tomando o cuidado de não estragar fragmento.
- ✓ Delimitou-se a área do corte com caneta Dako Pen.
- ✓ Pingou-se 100µl do anticorpo primário em cima do corte.
- ✓ Colocaram as lâminas dentro de uma caixa de acrílico ou recipiente plástico, e incubamos por 30 minutos em temperatura ambiente.
- ✓ Lavamos com tampão Dako na própria cuba, utilizando pissete.
  
- Após a reação com os anticorpos primários, lavar novamente as lâminas nas caixas acrílicas com solução tampão (WASH) e deixar novamente em solução tampão por 5 minutos;
- Retirar o tampão levantando as lâminas, levantando uma lâmina por vez, devolver na caixa novamente e pipetar o polímero HRP e deixar incubar por 20 minutos;
- Após, entrar novamente em processo de lavagem com a solução tampão por 2 vezes e descansar de 5 minutos em cada etapa;
- No caso de anticorpos (antimouse ou antirabbit) incubar o linker por 15 minutos e depois lavar com tampão;
- Na próxima etapa entrar em processo de revelação com o cromógeno SubstrateWorkingSolution (equivalente ao DAB), onde pipeta-se 2 vezes e fica em reação por 7 minutos em cada uma das vezes;
- Depois, lavar as lâminas com solução de lavagem (tampão wash) e colocá-las em carrinhos que serão levados às cubas de hematoxilina por 30 segundos em descanso, para depois serem lavadas em água corrente;
- Em seguida, cada carrinho é mergulhado na bateria de 4 cubas de álcool absoluto e 8 cubas de xilol, até serem trocadas de carrinhos e levadas à máquina de montagem de Lâminas (COVERSLEEP – DAKO).