

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

CARBO ANIMALIS E RESPOSTA IMUNE AO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS:
UM MODELO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental

Thayná Neves Cardoso

SÃO PAULO
2014

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

CARBO ANIMALIS E RESPOSTA IMUNE AO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS:
UM MODELO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Leoni Villano Bonamin.

Thayná Neves Cardoso

SÃO PAULO
2014

Cardoso, Thayná Neves.

Carbo animalis e resposta imune ao tumor ascítico de Ehrlich em camundongos: um modelo experimental / Thayná Neves Cardoso. - 2014.

37 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2014.

Área de concentração: Patologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Leoni Villano Bonamin.

1. Tumor ascítico de Ehrlich. 2. Homeopatia. 3. Carboanimalis.
4. Imunologia dos tumores. 5. Oncologia experimental. I. Bonamin,

Leoni Villano (orientador). II. Título.

Thayná Neves Cardoso

**CARBO ANIMALIS E RESPOSTA IMUNE AO TUMOR ASCÍTICO DE
EHRlich EM CAMUNDONGOS: UM MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof(a). Dr(a). Leoni Villano Bonamin

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/____/____
Prof. Nome do Professor
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Prof. Nome do Professor
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Prof. Nome do Professor
Universidade Paulista UNIP

Aos meus pais, Elizabeth e Gilmar, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida e terem sido a base para eu poder alcançar todos os meus sonhos, hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Gilmar e Elizabeth, por terem contribuído com a minha formação pessoal e acadêmica, por sempre demonstrarem interesse em minhas escolhas e pelo apoio incondicional. Sem eles não conseguiria alcançar meus ideais e objetivos.

Aos colegas colaboradores, que auxiliaram em toda execução do trabalho, com ideias, conselhos e boas energias para que tudo ocorresse da melhor maneira possível.

À professora Dra. Leoni, pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração e execução do trabalho, me incentivando e colaborando no desenvolvimento de minhas muitas ideias.

Ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP) da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de taxa para o estudo.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

***Carbo animalis* e resposta imune ao tumor ascítico de Ehrlich em camundongos: um modelo experimental**

Subtítulo: *Carbo animalis* e resposta imune a tumores

Thayná Neves Cardoso, Juliana Amaral, Aloísio Cunha de Carvalho, Luciane Costa Dalboni, Luana Ramos, Silvio Leite Monteiro da Silva, Fabiana Rodrigues Santana, Elizabeth Cristina Perez Hurtado, Leoni Villano Bonamin

UNIP, Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, São Paulo, Brasil.

Resumo

A qualidade de vida do paciente oncológico está em grande parte relacionada com a atividade do sistema imunológico. Relatos clínicos mostram a melhoria na qualidade de vida de pacientes terminais tratados com o medicamento homeopático *carbo animalis*, contudo, a literatura sobre esse tema é rara. O objetivo deste trabalho foi propor um modelo experimental para o estudo dos possíveis efeitos do *carbo animalis* na resposta imune a um carcinoma altamente maligno, bem como seu impacto no estado geral dos animais doentes. Camundongos machos Balb/c foram inoculados com tumor ascítico de Ehrlich e tratados com *carbo animalis* 6cH ou 6cH/30cH (associação de potências). O grupo controle foi tratado com o meso veículo sucussionado. Parâmetros clínicos foram analisados diariamente pela observação de pele, pelos, locomoção, estado geral, temperatura, consumo de água, ração e peso de cada indivíduo. A sobrevivência e a resposta imune local (peritoneal) também foram avaliadas. Linfócitos T, B1 e B2, NK e fagócitos foram identificados e quantificados por imunocitoquímica e citometria de fluxo. Os animais tratados com *carbo animalis* 6cH/30cH apresentaram aumento na incidência de sinais clínicos em relação aos demais grupos. Quanto ao balanço da resposta imune local, no grupo tratado com *carbo animalis* 6cH, houve aumento na proporção de células T CD25+ em relação às células T totais, diminuição na razão entre células CD19+/CD19-, bem como aumento na razão entre células B1/B2. Os animais tratados com *carbo animalis* 6cH/30cH, por sua vez, apresentaram aumento no número de células CD3+ e células NK aderidas às células tumorais e aumento na razão entre células CD19+/CD19-. Embora o significado clínico destes resultados ainda esteja sob discussão, este trabalho preliminar estabelece um protocolo experimental útil para o estudo dos mecanismos imunológicos deste e de outros medicamentos homeopáticos utilizados na terapia do câncer.

Palavras-chave: Tumor ascítico de Ehrlich. Altas diluições. Homeopatia. *Carbo animalis*. Imunologia dos tumores. Oncologia experimental.

Carbo animalis and immune response to Ehrlich ascites tumor in mice: an experimental model

Sub-title: Carbo animalis and immune response to tumors

Thayná Neves Cardoso, Juliana Amaral, Aloisio Cunha de Carvalho, Luciane Costa Dalboni, Luana Ramos, Silvio Leite Monteiro da Silva, Fabiana Rodrigues Santana, Elizabeth Cristina Perez Hurtado, Leoni Villano Bonamin

UNIP, Graduate Program in Environmental and Experimental Pathology, São Paulo, Brazil.

Abstract

The quality of life in cancer patients is largely related to the activity of the immune system. Clinical reports show the improvement in the quality of life of terminally ill patients treated with homeopathic medicine carbo animalis, however, the literature on this subject is rare. The objective of this study was to propose an experimental model to study the possible effects of carbo animalis in the immune response to a highly malignant carcinoma, as well as their impact on the general condition of the sick animals. Male mice BALB / c mice were inoculated with Ehrlich ascites tumor and treated with carbo animalis 6cH or 6cH / 30cH (potency association). The control group was treated with the same succussed vehicle. Clinical parameters were analyzed daily by observation skin, hair, locomotion, general condition, temperature, water and food consumption and weight of each individual. Survival and local immune response (peritoneal) were also evaluated. T lymphocytes, B1 and B2, NK cells and phagocytes were identified and quantified by immuno-cytochemistry and flow cytometry. Animals treated with carbo animalis 6cH / 30cH showed increased incidence of clinical signs than other groups. As for the balance of the local immune response, in the group treated with carbo animalis 6cH there was an increase in the proportion of T cells CD25 + in relation to total T cells, decreased the ratio of CD19 + / CD19- and increase the ratio of B1 / B2 cells . In the other hand the animals treated with carbo animalis 6cH / 30cH showed an increase in the number of CD3 + cells and NK cells adhered to tumor cells and increased the ratio of CD19 + / CD19- cells. Although the clinical significance of these findings is still under discussion, this preliminary work provides a useful experimental protocol for the study of the mechanisms of this and other homeopathic medicines used in cancer therapy.

Keywords: Ehrlich ascites tumor, high dilutions, homeopathy, carbo animalis, immunology of tumors, experimental oncology.

Sumário

Introdução	8
Métodos	11
Animais.....	11
Bioética.....	11
Grupos experimentais e tratamentos	12
Inoculação do tumor de Ehrlich.....	13
Obtenção e contagem das células da cavidade peritoneal	14
Citometria de fluxo	15
Imunocitoquímica	18
Histopatologia e histometria do baço	20
Análise estatística.....	21
Resultados.....	22
Discussão	30
Conclusão	33
Referências	34

Introdução

Sabemos dos notáveis avanços da medicina oncológica e também da rápida evolução das pesquisas, que resultaram na criação de completos e complexos bancos de dados na área da oncologia (HANAHAN et al., 2000). Apesar disso, o câncer ainda é uma das doenças que mais causam mortes hoje em dia. As neoplasias possuem diversos mecanismos que justificam sua alta letalidade. Segundo Hanahan e Weinberg, 2010, existem ao menos seis desses mecanismos que podem ser descritos e entendidos, são eles: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores do crescimento, capacidade de invasão tecidual e metástase, ausência de limites para o potencial de replicação, grande capacidade angiogênica, poder de evasão de apoptose, capacidade de desregular a energia celular, escape à destruição pelo sistema imune, capacidade de provocar inflamação, instabilidade do genoma e mutações.

Paralelamente, as terapias complementares e alternativas vêm ganhando importância mundial nos últimos anos. Nos Estados Unidos, aproximadamente quatro entre nove adultos e uma em cada dez crianças estão usando algum tipo de terapia alternativa (PREETHI et al., 2012). A homeopatia, ciência nascida na Alemanha no final do século 18, vem sendo amplamente aplicada na clínica médica humana e veterinária, sendo seu uso oficial em alguns países, como o Brasil (BONAMIN, 2008). Na tentativa de compreender seus mecanismos, ainda mal esclarecidos, pesquisadores vêm desenvolvendo modelos experimentais específicos para tais estudos. Revisões recentes

mostram que estudos realizados nos últimos dez anos apresentaram alta reprodutibilidade de resultados e consolidaram a hipótese de que os medicamentos homeopáticos possuem mais uma ação moduladora sobre funções celulares do que ação efetora, tal como seria observado em drogas convencionais (BONAMIN, 2008; BONAMIN, ENDLER, 2010; ENDLER et al., 2010). Segundo Bellavite et al., 2014, a ação de tais medicamentos no organismo depende da identificação de diferentes alvos biológicos, que podem ser celulares, moleculares ou sistêmicos.

A constatação destes alvos múltiplos explica as dificuldades de elucidação dos mecanismos envolvidos, o que é ainda mais crítico em relação aos pacientes oncológicos (PETERSON, 2002). Contudo, efeitos positivos do uso de medicamentos homeopáticos no tratamento de vários tipos de câncer, bem como efeitos moduladores de vias intracelulares de controle do crescimento e diferenciação *in vitro* foram documentados recentemente (KHUDA-BUKHSH et al., 2011; MACLAUGHLIN et al., 2006; BELLAVETE et al., 2014; SAHA et al., 2013); SUNILA et al., 2007).

Um dos medicamentos homeopáticos menos estudados na homeopatia é o *carbo animalis*, preparado a partir de couro bovino calcinado. Diz-se que Hahnemann colocava pedaços de couro de boi grossos sobre carvões acesos até que queimassem totalmente. Esse material era prensado e, quando frio, era pulverizado resultando em um pó, o qual era diluído (MORENO, 2008). A absoluta falta de literatura sobre o tema leva a comunidade científica a negligenciar o assunto, mas sua indicação pela homeopatia tradicional justifica

a realização de estudos sistemáticos cuidadosos para averiguação do seu real potencial terapêutico, sobretudo em relação aos possíveis benefícios na qualidade de vida de pacientes graves. Assim, a atenuação de sinais e sintomas próprios de pacientes terminais, como prostração, ansiedade, desespero, tristeza, distensão abdominal, epistaxe, cianose de pele, sudorese, etc., são descritos como parâmetros eletivos para a prescrição deste medicamento (DEMARQUE et al., 2003). Interpretando a matéria médica segundo Brunini e Giorgi (2010), esse medicamento deve ser usado para pacientes que apresentam prostração, falta de energia vital, um quadro associado a algo antigo, crônico. Ainda, segundo Moreno (2008) o *carbo animalis* seria um medicamento de destaque para neoplasias, principalmente de mama e outras que tenham infiltrado com cor mais escura e aspecto purulento, sendo assim um fármaco com indicação na matéria médica para o tratamento de algumas neoplasias malignas.

Notamos que o medicamento homeopático *carbo animalis* é citado em pelo menos três dos protocolos indicados pela Prasanta Banerji Homeopathic Research Foundation (PBHRF) para o tratamento de carcinoma de esôfago, câncer de útero, *cervix*, ovário, apêndice e cólon. O Dr Banerji mantém essa fundação na Índia (onde mais de 100 milhões de pessoas se tratam com medicamentos homeopáticos) e utiliza medicamentos homeopáticos como único método de tratamento de diversas doenças, incluindo neoplasias. A PBHRF atende em média 3.500 pacientes oncológicos por ano, utilizando protocolos próprios (disponível em: <http://www.pbhrfindia.org>).

O presente estudo, portanto, tem o objetivo de propor um modelo experimental murino para o estudo dos efeitos do *carbo animalis* na resposta imune e no estado geral de indivíduos portadores de tumores muito malignos.

Métodos

Animais

Foram utilizados 25 camundongos da linhagem Balb/c, machos (6 a 9 semanas de vida), mantidos em microisoladores (Techniplast®), no biotério de Experimentação animal do Centro de Pesquisa da UNIP (Campus Indianópolis), com água e ração *ad libitum*, controle de temperatura (22 ± 2 °C), umidade (55-65%), trocas de ar (75/hora) e ciclos claro e escuro 12/12horas. Todo o estudo foi feito em cego. Os frascos dos medicamentos foram reetiquetados antes do início dos experimentos por pessoal não envolvido com a sua condução. Os códigos foram revelados somente após o término de todas as análises estatísticas.

Bioética

O projeto foi aprovado pelo CEUA – UNIP em 17/04/2013 (protocolo 159/13).

O número de animais foi o mínimo necessário para a aplicação de testes estatísticos, gerando resultados confiáveis, considerando as condições ideais de biotério e a isogenicidade da linhagem estudada (Balb/c).

Grupos experimentais e tratamentos

Experimento 1

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo para cada grupo N = 5:

Grupo experimental: os camundongos foram tratados com ***carbo animalis 6cH***, diluído e sucussionado em água, a partir de matriz fornecida por farmácia homeopática credenciada pela ANVISA (Sensitiva®).

Grupo controle: os camundongos foram tratados com ***veículo (água ultrapura)***, diluído e sucussionado a partir de matriz (*solução hidroalcoólica 30% sucussionada*) fornecida por farmácia homeopática credenciada pela ANVISA (Sensitiva®).

Experimento 2

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, sendo para cada grupo N = 5:

Grupo experimental 1: os camundongos foram tratados diariamente por via oral com ***carbo animalis 6cH***, diluído e sucussionado em água.

Grupo experimental 2: os camundongos foram tratados diariamente por via oral com ***complexo carbo animalis 6cH e 30cH***, diluído e sucussionado em água.

Grupo controle: os camundongos foram tratados diariamente por via oral com **veículo (água ultrapura)** diluído e sucussionado a partir de matriz (*solução hidroalcoólica 30% sucussionada*).

Após 24 horas de inoculação do tumor, os camundongos receberam uma dose via oral de 10 µL de medicamento/10 g de peso vivo/animal utilizando pipeta automática (Eppendorf® de 100 µl) e, assim, diariamente até o óbito no experimento 1 e, por quinze dias, no experimento 2, quando os animais foram eutanasiados e o fluido ascítico foi colhido para análises. A diluição e a sucussão final do medicamento (100 vezes) foram feitas em braço mecânico específico para este fim (Autic®), a partir de matriz fornecida por farmácia homeopática credenciada pela ANVISA (Sensitiva®). As matrizes foram *carbo animalis* 5cH e *carbo animalis* 29cH.

A inserção de um novo grupo tratado com complexo preparado com diferentes potências homeopáticas (“acorde de potências”) 6cH e 30cH foi baseada em estudos prévios sobre peritonite murina, em que se observou potencialização do efeito protetor dos medicamentos estudados pela mistura de potências (PEDALINO et al., 2004).

Inoculação do tumor de Ehrlich

Inoculamos 0,1 mL de suspensão celular do tumor de Ehrlich (1×10^6 células), *i.p* para obtenção do tumor na forma ascítica. Foi realizada a retirada de líquido ascítico de camundongos de repique, o qual foi centrifugado e ressuspendido

em PBS por 4 vezes, para lavagem das células. A viabilidade celular foi determinada pela técnica do azul de tripano 0,1% e a contagem das células foi feita em câmara de Newbauer. Apenas as amostras com viabilidade celular maior ou igual a 90% foram utilizadas.

Os camundongos inoculados com tumor de Ehrlich via intraperitoneal foram pesados antes da inoculação do tumor e todos os dias em que durou o experimento, até a eutanásia (experimento 2) ou a morte natural (experimento 1). Todos os animais foram avaliados diariamente, sendo observadas e anotadas quaisquer alterações no comportamento, pelos, pele, olhos, genitália, sistema respiratório, sistema nervoso, sistema locomotor, fezes, temperatura do corpo, bem como consumo de água e ração.

Obtenção e contagem das células da cavidade peritoneal

No experimento 2, 15 dias após a inoculação do tumor de Ehrlich, todos os animais foram eutanasiados com *overdose* de anestésico geral, seguida de deslocamento cervical e necropsiados. Após a eutanásia, 5 mL do fluido peritoneal ascítico foram retirados. As células foram lavadas em 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) estéril com centrifugações sucessivas a 1.500 rpm por 5 minutos, sendo a última lavagem feita em tampão hemolítico, antes do início dos procedimentos de marcação para citometria. Parte do fluido foi processada para incubação com marcadores específicos e análise em citometria de fluxo. Outra parte foi utilizada para a confecção de esfregaços a fresco, em lâminas silanizadas, sendo fixados em metanol absoluto por 10

minutos a 4 °C e estocados em freezer a –10 °C para posterior processamento imunocitoquímico.

Citometria de fluxo

Após a eutanásia dos animais, injetou-se 5 mL de PBS-SFB 1% na cavidade peritoneal já com a pele aberta. Massageado o local para desprender as células, o fluido foi transferido para um tubo Falcon 15 mL e mantido em gelo. Os animais foram, então, necropsiados para retirada do baço, que foi pesado. Um fragmento central foi fixado em PFA 8% para análise histopatológica. Todos os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 2.000 rpm por 5 minutos, sendo retirado o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 2 mL de tampão hemolítico e novamente centrifugadas. Este procedimento foi repetido três vezes, até a retirada completa das hemácias. Então, as células foram novamente ressuspensas em 1 mL de PBS em câmara de Neubauer, utilizando o método do azul de tripano 0,1% para a identificação da viabilidade celular.

Em seguida, 10 microlitros de Fc block (anti-CD16/32) foram adicionados a 990 microlitros de PBS-BSA 1%, para preparo da solução bloqueadora, sendo colocados sobre a amostra 10 microlitros desta última, que foi ressuspensa e incubada a 4 °C por 30 minutos. Após nova lavagem em PBS, o conteúdo de cada tubo foi passado para três microtubos em um volume calculado para conter 10^6 células em cada microtubo. Um tubo foi designado como *sem marcar*, um tubo como *combo 1* (linfócitos B) e um tubo como *combo 2*

(linfócitos T). Uma sequência adicional de amostras foi separada para a *marcação simples*, com cada um dos marcadores, para a compensação da positividade das amostras. Para cada 10^6 células foram adicionados 20 microlitros de anticorpo específico a 1%, seguido de incubação a 4 °C por 40 minutos, conforme Quadro 1.

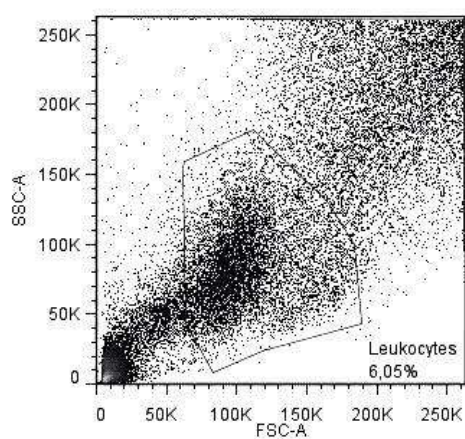
Quadro 1 – Marcadores utilizados para análise de leucócitos infiltrantes de tumor por citometria de fluxo do lavado peritoneal de camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma ascítica

Combo 1	CD 23 FITC	Combo 2	CD25 AF488
	CD 5 PE		CD 4 PE
	CD 19 PE Cy 5:5		CD 19 PE Cy 5:5
	CD 11b PB		CD8 AF 405

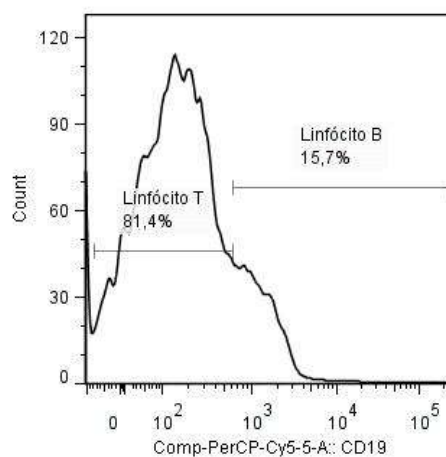
Após a incubação, 1 mL de PBS foi adicionado às células, para lavagem. Sendo estas ressuspensas e centrifugadas a 3.000 rpm em microcentrífuga Spin por 3 minutos. Em seguida, as células foram novamente ressuspensas em 100 microlitros de PBS-BSA 1% e 400 microlitros de PFA 1%, para fixação. As amostras foram mantidas a 4 °C e embaladas em papel alumínio por até 48 horas antes da contagem no citômetro Canto BD. Os dados foram processados no *software* FlowJo 7.6.5 para identificação dos *gates* a serem analisados, que estão indicados na Figura 1.

Figura 1 – Imagem gráfica obtida pelo software FlowJo 7.6.5 demonstrando os *gates* e populações celulares peritoneais analisadas pela citometria de fluxo. (A) População de leucócitos peritoneais; (B) Porcentagem de linfócitos não B (CD19-) e B (CD19+) do peritônio; (C) Porcentagem de células positivas para marcação de CD25 (células T reguladoras / T ativadas); (D) Porcentagem de células peritoneais positivas para os marcadores CD4 e CD8; (E) Porcentagem de células B-1 (CD19+ CD11b+), B-2 (CD19+ CD11b-) e de fagócitos (CD19- CD11b+); (F) Porcentagem de células B1-a (CD5-) e B1-b (CD5+).

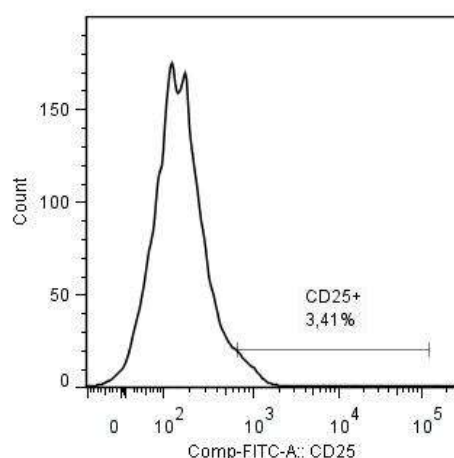
A



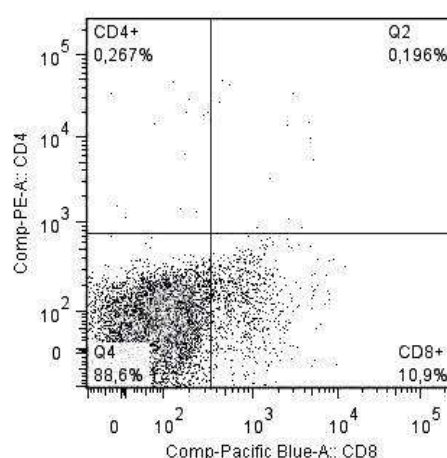
B

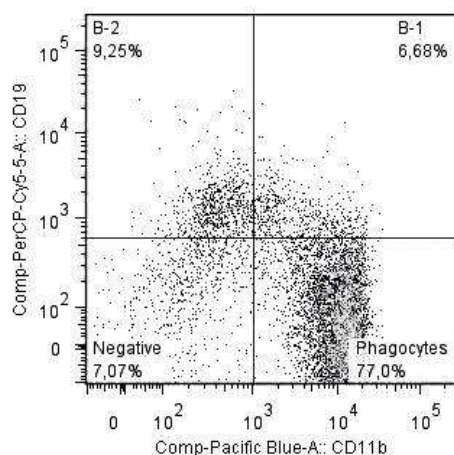
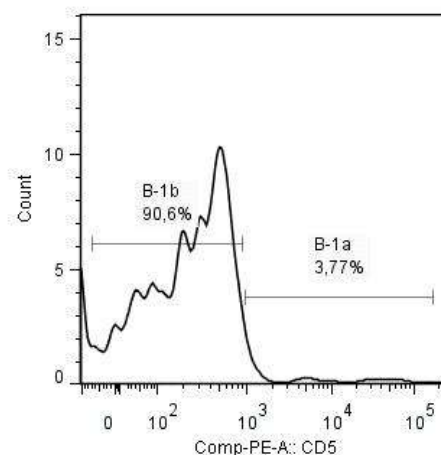


C



D



E**F**

Imunocitoquímica

Para complementar os dados obtidos na citometria de fluxo, um protocolo adicional de imunocitoquímica foi executado, a partir dos esfregaços do fluido peritoneal. Nesta análise, tanto a contagem diferencial das células, quanto a ocorrência dos eventos de citotoxicidade, caracterizadas pelo número de células positivas aderidas às células tumorais, podem ser observadas visualmente, o que não é possível na citometria de fluxo (Figura 2).

Os procedimentos de imunocitoquímica foram feitos da seguinte forma: (a) bloqueio da peroxidase endógena com incubação por 15 minutos em solução de H_2O_2 5% (MERCK), diluída 1 : 4 em álcool metílico PA (MERCK); (b) bloqueio de sítios inespecíficos de ligação dos anticorpos com soro heterólogo; (c) incubação com anticorpo primário *overnight* a 4 °C, em câmara úmida, sendo as diferentes diluições do anticorpo primário feitas em diluente amplificador para desmascaramento antigênico (DAKO); (d) incubação por 30 minutos com kit Impress Universal (VECTOR) – anticorpo secundário conjugado a micropolímeros associados à peroxidase; (e) incubação com DAB

(DAKO) por 3 segundos. Entre as diferentes etapas, fez-se a lavagem das lâminas em PBS por 6 minutos. Ao final, após lavagem em água corrente, os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Harris e montados entre lâmina e lamínula.

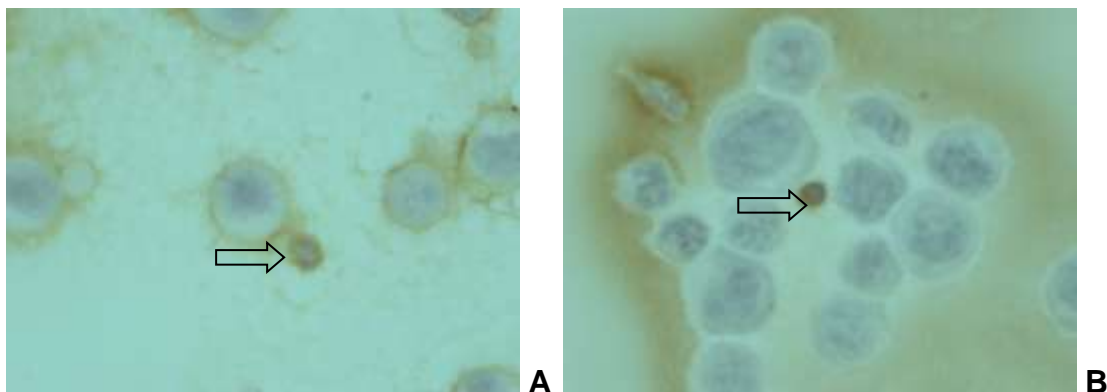
Os marcadores utilizados na imunocitoquímica estão representados no Quadro 2.

Quadro 2 – Marcadores utilizados na imunocitoquímica

Marcador	Finalidade	Alvo molecular	Espécie doadora	Clone	Diluição	Marca
CD3	Linfócitos T	Proteína transmembrana	Rato	Clone KT3	1 : 40	Serotec
CD34	Células progenitoras hematopoiéticas	Proteína transmembrana	Rato	Monoclonal	1 : 200	Serotec
CD11b	Granulócitos e monócitos ativados	Proteína transmembrana	Rato	Clone M1/70.15	1 : 10	Serotec
Anti-asialo GM 1	Células <i>natural killer</i>	Gangliosídeo de membrana	Coelho	Policlonal	1 : 300	Wako Pure Chemical Industries Ltd

O controle negativo foi feito simultaneamente para cada série, pela adição de diluente puro em uma das lâminas. Quarenta campos por lâmina foram observados e as células positivas para cada marcador foram contadas.

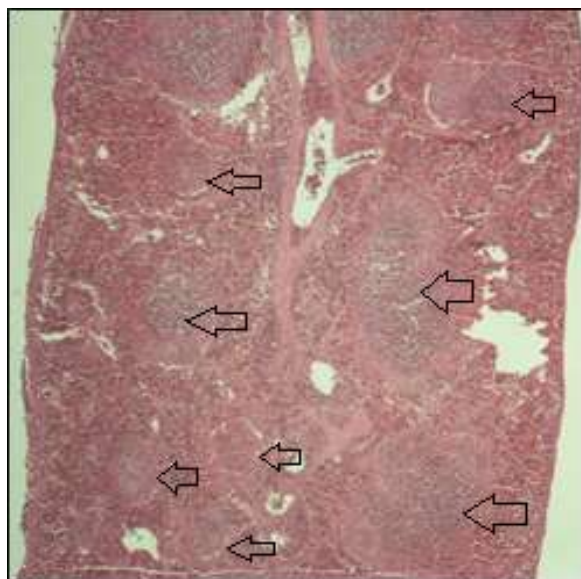
Figura 2 – Fotomicrografia de linfócitos (setas) CD3+ (A) e linfócitos asialo-GM1+ (NK) (B) marcados por imunocitoquímica (DAB) e aderidos à célula tumoral em esfregaço de lavado peritoneal de camundongo portador de tumor ascítico de Ehrlich há 10 dias. Objetiva: 1.000x



Histopatologia e histometria do baço

O fragmento de baço colhido durante a necropsia foi corado pelo método HE (hematoxilina-eosina). Para análise da proporção entre polpa branca e área total do corte, duas fotos de cada lâmina foram capturadas em um fotomicroscópio Nikon E200 acoplado à câmera Nikon Coolpix, utilizando objetiva de 4x. O *software* Metamorph® foi utilizado para delimitar e calcular a razão entre a área total do corte (em *pixels*) e a área de polpa branca (em *pixels*), conforme Figura 3.

Figura 3 – Fotomicrografia de parênquima total de baço de camundongo portador de tumor ascítico de Ehrlich há 10 dias corado por HE. A área de polpa branca está indicada por setas. Objetiva: 4x



Análise estatística

No experimento 1 (dois grupos), para o teste de sobrevida, utilizamos o método Log-Rank (Mantel-Cox) test (*software* PRISM 5.04). Para mensurar os parâmetros clínicos foi usado o teste “t” de Student (INSTAT 3.0) e para análise do consumo de água e ração, o teste de Mann Whitney (INSTAT 3.0). Para a análise dos dados do experimento 2 (três grupos), utilizamos Anova seguida de Tuckey-Krammer para dados paramétricos (área de polpa branca no baço) ou Kuskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para dados não paramétricos (contagem de células marcadas no esfregaço, consumo de água e ração e parâmetros clínicos). A determinação da homocedasticidade das variáveis foi feita pelo teste de Bartlett (INSTAT 3.0). Para análise da citometria, as proporções entre as diferentes populações celulares do peritônio foram

analisadas pelo teste do X^2 . Para todos os casos, os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

Experimento 1

A incidência de sinais clínicos foi observada nos dois grupos, tratado e controle, mostrando que 60% dos animais tratados com *carbo animalis* 6cH e 60% dos animais do grupo controle apresentaram apatia. Esse mesmo percentual foi observado para letargia, cianose e piloereção; 40% dos animais tratados e 20% dos animais controle apresentaram taquipneia e priapismo. Prostração e aparecimento de secreção peniana foram observados apenas nos animais tratados (40%). Edema peniano e fezes amolecidas foram observados apenas nos animais controle (20%) (Tabela 1A).

O pico de incidência dos sintomas se deu no décimo oitavo dia após a inoculação do tumor em ambos os grupos.

Tabela 1 – (A) Frequência (%) de sinais clínicos ao longo do período de sobrevida de camundongos inoculados com tumor de Ehrlich na forma ascítica e tratados diariamente, por via oral, com *carbo animalis* 6cH ou veículo (controle). (B) Média e desvio padrão de peso, temperatura corpórea e consumo de água e ração. Teste “t” de Student, * $p \leq 0,03$ em relação ao controle

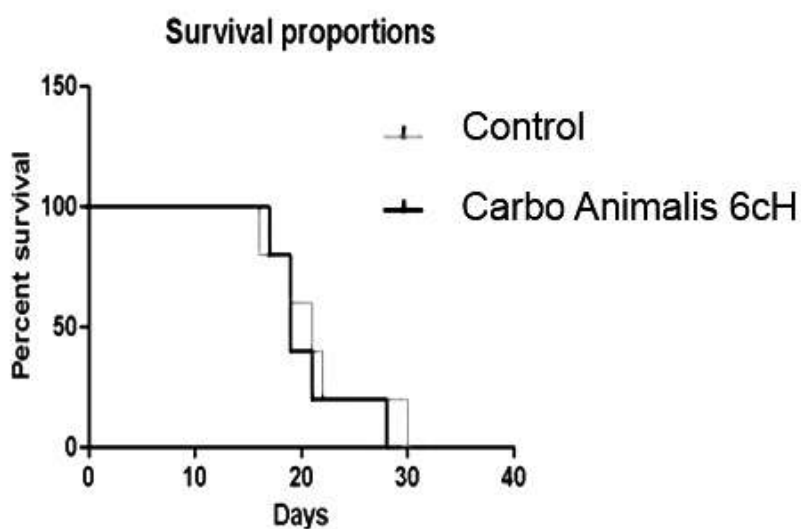
(A) Incidência de sintomas (%)		
	<i>Carbo animalis</i> 6cH	Controle
Apatia	60	60
Prostração	40	0
Cianose	60	60
Priapismo	40	20
Secreção peniana	40	0
Taquipneia	40	20
Edema peniano	0	20
Letargia	60	60
Piloereção	60	60
Fezes amolecidas	0	20

(B) Temperatura, consumo de alimentos, peso		
	<i>Carbo animalis</i> 6cH	Controle
Temperatura máxima	34,86C \pm 1,270	32,2C \pm 0,529
Temperatura mínima	25,84C \pm 3,397	25,74C \pm 2,865
Média temperatura	30,28 \pm 1,732	30,42 \pm 0,858
Consumo médio ração (#)	5,69 g*	4,86 g*
Consumo médio água (#)	6,68 mL*	6,2 mL*
Peso inicial	28,76g \pm 1,139	28,56g \pm 0,723
Peso final	46,36g \pm 4,130	44,08g \pm 3,399
Delta peso	17,6 \pm 3,163	15,52 \pm 3,552

(#) animais alocados na mesma caixa. Consumo calculado por caixa. Não há, portanto, desvio padrão neste caso.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à temperatura do corpo e peso dos animais, porém diferença estatisticamente significativa foi observada no consumo de água e ração (Tabela 1B). Não observamos alteração estatisticamente significativa em relação à sobrevivência (Figura 4).

Figura 4 – Frequência (%) de sobrevivência ao longo dos dias de camundongos inoculados com tumor de Ehrlich na forma ascítica e tratados diariamente, por via oral, com *carbo animalis* 6cH ou veículo (controle). Método Log-Rank (Mantel-Cox) test (software PRISM 5.04)



Experimento 2

A totalidade dos animais tratados com *carbo animalis* 6cH/30cH apresentou apatia, cianose, letargia e pelos eriçados. Dos animais tratados com *carbo animalis* 6cH, 80% tiveram essa sintomatologia. No grupo controle, 80% dos

animais apresentaram cianose e todos os animais apresentaram piloereção, mas os demais sintomas não foram observados (Tabela 2A). Nos três diferentes grupos, não houve diferença na variação de temperatura corpórea, consumo de água e ração entre os animais ao longo dos dias de observação (Tabela 2B).

O início da incidência dos sintomas no grupo tratado com a potência 6cH e no grupo tratado com acorde de potências ocorreu no nono dia após a inoculação do tumor. No caso do grupo controle, os sintomas se iniciaram no dia 12 após a inoculação. Todos os grupos apresentaram pico de incidência dos sintomas no 15º dia após a inoculação do tumor.

Tabela 2 – (A) Frequência (%) de sinais clínicos ao longo do período de sobrevida de camundongos inoculados com tumor de Ehrlich na forma ascítica e tratados diariamente, por via oral, com *carbo animalis* 6cH, *carbo animalis* 6cH/30cH ou veículo (controle). (B) Média e desvio padrão de peso, temperatura corpórea e consumo de água e ração. Kruskal-Wallis

(A) Incidência de sintomas (%)			
	<i>Carbo animalis</i> 6cH	<i>Carbo animalis</i> 6cH/30cH	Controle
Apatia	80	100	0
Cianose	80	100	80
Letargia	80	100	0
Piloereção	80	100	100

(B) Temperatura, consumo de alimentos, peso			
	<i>Carbo animalis</i> 6cH	<i>Carbo animalis</i> 6cH/30cH	Controle
Temperatura máxima	36,98C ± 0,28	36,58C ± 1,87	37,48C ± 0,63
Temperatura mínima	31C ± 0,83	30,34C ± 0,76	30,88C ± 1,16
Média temperatura	34,76 ± 0,48	34,82 ± 0,35	34,78 ± 0,319
Consumo médio ração (#)	4,47 g	4,5 g	3,8 g
Consumo médio água (#)	4,89 mL	5,45 mL	5 mL
Peso inicial	24,13 ± 1,24	25,68 ± 1,51	24,7 ± 1,25
Peso final	34,21 ± 4,87	38,41 ± 2,71	35,9 ± 2,76
Delta peso	10,08 ± 5,67	12,72 ± 1,40	11,2 ± 2,19

(#) animais alocados na mesma caixa. Consumo calculado por caixa. Não há, portanto, desvio padrão neste caso.

Observando os dados da leitura das lâminas de imunocitoquímica, nota-se que animais tratados com *carbo animalis* 6cH apresentaram discreta redução no número de células NK aderidas às células tumorais e aumento do número de fagócitos por campo. O grupo tratado com *carbo animalis* 6cH/30cH apresentou

aumento no número de células NK por campo, incluindo aquelas aderidas às células tumorais, representando citotoxicidade. O número de células CD3+ (linfócitos T) aderidas às células tumorais também aumentou neste grupo. Não houve diferenças entre os grupos no número de células CD34+ por campo (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de células positivas para CD34 (células imaturas provenientes da medula óssea), CD11b (fagócitos), CD3 (linfócito T) e asialo GM1 (célula NK) por campo microscópico, aderidas ou não a células tumorais, nos diferentes grupos. O material analisado foi esfregaço de fluido ascítico de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich há 10 dias. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Kruskal-Wallis/Dunn, * $p \leq 0,001$ em relação ao controle

	<i>Carbo animalis</i> 6cH	<i>Carbo animalis</i> 6cH/30cH	Controle
CD3 não aderido (NA)	0,8662 \pm 1,0192	0,8937 \pm 1,469	0,9344 \pm 1,0736
CD3 aderido (A)	0,6901 \pm 1,0258	3,25 \pm 3,3308 *	0,7705 \pm 1,1484
Razão CD3 A/NA	0,445	0,785	0,453
CD34	0,25 \pm 0,4385	0,3417 \pm 0,6798	0,2625 \pm 0,5318
NK não aderido (NA)	0,2 \pm 0,4862	1,0774 \pm 1,3747*	0,3216 \pm 0,6655
NK aderido (A)	0,4062 \pm 0,7207*	1,9102 \pm 2,4896*	0,8187 \pm 1,0214
Razão NK A/NA	0,669	0,639	0,718
CD11b	1,41 \pm 0,8094*	0,99 \pm 1,0173	1,045 \pm 0,8464

A histometria do baço revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA) no que diz respeito à proporção área de polpa branca / área total do corte (em *pixels*), sendo: *Carbo animalis* 6cH/30cH: 0,069 \pm 0,030; *Carbo animalis* 6cH: 0,067 \pm 0,028; Controle: 0,083 \pm 0,037.

Por fim, os dados obtidos a partir da citometria de fluxo revelaram diferença não significativa entre os grupos em relação ao valor absoluto de células positivas nos *gates* selecionados (Tabela 4). Entretanto, o balanço entre os diferentes tipos celulares, analisados pelo teste do X^2 , revelou que os animais tratados com *carbo animalis* 6cH apresentam menor proporção de células CD19+ em relação às células CD19-, mostrando predomínio de linfócitos T no infiltrado inflamatório tumoral em comparação ao controle. Eles também apresentaram aumento na proporção de linfócitos CD25+ em relação ao total de CD19- e predomínio de células B1b. Mas os animais tratados com *carbo animalis* 6cH+30cH mostraram discreto, porém, significativo aumento na proporção CD19+/CD19-, com predomínio de células B1, sem apresentar variações entre B1a e B1b em relação ao controle (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de células positivas para marcadores específicos nos *gates* selecionados a partir da citometria de fluxo do lavado peritoneal de camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma ascítica durante 10 dias. Os valores representam média \pm desvio padrão. Anova. A razão entre subtipos celulares está representada em porcentagem.

Subtipos celulares	<i>Carbo animalis</i> 6cH	<i>Carbo animalis</i> 6cH + 30cH	Controle
Total B (CD19+)	1103,8 \pm 376,5	1441,6 \pm 197,62	1364,0 \pm 306,40
Total T (CD19-)	7186,6 \pm 502,25	6853,2 \pm 186,54	7260,6 \pm 801,47
B-2 (CD19+ CD23+)	555,6 \pm 188,66	695,8 \pm 120,47	764,4 \pm 192,65
B-1 (C19+ CD23-)	459,6 \pm 144,08	585,00 \pm 113,31	584,4 \pm 193,29
B-1a	10,8 \pm 5,26	20,8 \pm 8,04	23,6 \pm 11,54
B-1b	408,4 \pm 114,60	506,2 \pm 95,26	505,00 \pm 152,70
CD4+	11,8 \pm 2,38	15 \pm 5,96	13 \pm 3,39
CD8+	1209,8 \pm 391,16	1066,2 \pm 418,10	1247,8 \pm 407,12
CD25+	318,8 \pm 80,18	243,8 \pm 96,11	251,4 \pm 73,18
Razão CD19+/CD19- (B/T)	15% **	21% **	19%
Razão CD 25+/CD19- (T reg/Ttotal)	4,43% **	3,55%	3,46%
Razão B1 / B2	82,72% *	84,07% *	76,45%
Razão B1a / B1b	2,64% **	4,10%	4,67%
Razão CD4+/CD8+	0,97%	1,4%	1,0%

Teste χ^2 , * $p \leq 0,03$ e ** $p \leq 0,001$ em relação ao controle

Discussão

A homeopatia é uma ciência estabelecida e usada há mais de 200 anos. Os medicamentos homeopáticos são capazes de estimular a autorregulação dos sistemas vivos em que atuam (BELLAVITE et al., 2014). Em alguns casos, tais efeitos se apresentam como resultados biológicos sutis, assim, estudos focados na regulação celular e molecular, sobretudo *in vitro*, têm sido muito úteis na elucidação dos mecanismos epigenéticos de regulação tumoral (SAHA et al., 2013).

No presente trabalho, observa-se que, no experimento 1, houve maior incidência de sintomas clínicos no grupo tratado com *carbo animalis* 6cH, sem alteração do tempo de sobrevida. No experimento 2, entretanto, com a inserção do grupo tratado com *carbo animalis* 6cH/30cH, achados interessantes em relação à resposta imune local foram obtidos, embora nenhum efeito clínico benéfico tenha sido constatado nos animais tratados.

A análise da resposta imune local revelou efeitos interessantes no balanço entre os subtipos leucocitários infiltrados no local de crescimento tumoral. Assim, a administração de *carbo animalis* na potência 6cH induziu maior migração de fagócitos para o sítio de inoculação do tumor, como demonstrado pela imunocitoquímica. Estudos futuros são necessários para identificar as possíveis diferenciações destas células CD11b+, uma vez que há possibilidade de haver desvio para M2, conforme demonstrado na literatura (PORTA et al., 2014). Já no grupo tratado com *carbo animalis* 6cH/30cH houve maior

migração de células T (CD3+) e células NK (asialo-GM1+) para o peritônio, sendo que maior número de eventos de citotoxicidade também foi observado neste grupo.

O que sabemos em relação às células NK (*natural killers*) e sua atividade antitumoral é que esse grupo celular não é encontrado em números significativos em neoplasmas avançados, indicando que um número baixo dessa células seja responsável pelo potencial metastático que o tumor apresenta. Da mesma forma, baixa quantidade de células NK pode representar aumento do risco de desenvolver câncer. Assim, o infiltrado tumoral com presença maciça de células NK está associado a prognóstico positivo para diferentes tipos de carcinomas, lembrando que as células NK têm demonstrado selecionar a célula tumoral da célula saudável, mantendo assim a integridade dos tecidos viáveis (BORTONCELLO, 2013).

A citometria de fluxo revelou também que, ao contrário do que se observa em camundongos hígidos, os portadores de tumor ascítico de Ehrlich apresentaram 6 a 7 vezes mais células CD19- (linfócitos T, fagócitos ou células NKT) em relação às células CD19+ (linfócitos B). Ainda, os animais tratados com *carbo animalis* 6cH exibiram predomínio de células CD25+ entre a população de linfócitos CD19-, quando comparado ao controle, conforme se vê nas proporções calculadas: 4,43% no grupo tratado com *carbo animalis* 6cH e 3,46% no grupo controle. Os animais tratados com *carbo animalis* 6cH/30cH apresentaram valores intermediários (3,55%). Embora o percentual seja pequeno, é importante ressaltar que células T CD25+ são geralmente

minoritárias no peritônio murino e tais variações são biologicamente representativas. A hipótese que se apresenta, neste caso, é a de que tais células seriam majoritariamente células T ativadas (ABBAS, 2011).

Quanto à proporção entre linfócitos B1 e linfócitos B2, ambos os grupos experimentais apresentaram aumento significativo em relação ao controle. Contudo, somente no grupo tratado com *carbo animalis* 6cH pôde-se observar redução significativa na proporção B1a / B1b, sugerindo haver um importante papel das células B1, em especial B1b, na regulação da resposta imune local ao tumor neste grupo. Em alguns estudos, células B1 estão relacionadas com fatores anti-inflamatórios e pró-neoplásicos, sendo demonstrado aumento do potencial metastático em melanoma murino (BARBEIRO, 2009; VIVANCO et al., 2014). Contudo, em relação à imunidade tumoral contra o tumor ascítico de Ehrlich, observa-se o papel protetor das células B1 sobre o crescimento tumoral e o controle imunológico de metástases (AZEVEDO et al., 2014).

A ausência de alterações arquiteturais no baço dos animais nos diferentes grupos sugere haver pequeno impacto da resposta imune sistêmica na ação do medicamento estudado, sendo os dados mais contundentes observados a partir do infiltrado leucocitário tumoral, ou seja: na resposta imune local. Contudo, é importante ressaltar que, embora a análise histológica seja uma boa triagem para avaliação da resposta imune, estudos mais detalhados sobre a organização da resposta imune sistêmica são necessários para se obter conclusões definitivas.

Curiosamente, a administração de *carbo animalis* 6cH/30cH (acorde de potências) revelou efeitos diversos daqueles observados no grupo tratado com *carbo animalis* 6cH, sugerindo que a adição de potências acima do número de Avogadro pode interferir na atividade de medicamentos homeopáticos utilizados concomitantemente.

Outro ponto para ser considerado é o modelo experimental de Ehrlich *versus* o tratamento homeopático. Por se tratar de uma neoplasia agressiva e considerando o princípio de agravação, é possível que os achados clínicos desfavoráveis possam estar relacionados a este fenômeno, mas sua comprovação ainda depende de estudos específicos.

Conclusão

Embora o significado clínico destes resultados ainda esteja sob discussão, este trabalho preliminar estabelece um protocolo experimental útil para o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na ação deste medicamento. Mostra também a possível modulação de parâmetros imunológicos determinados pela associação de potências homeopáticas, bem como a necessidade de se investigar medicamentos homeopáticos ainda negligenciados na pesquisa e prática da oncologia.

Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunidade aos microrganismos. Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2011.

AZEVEDO, M. C. et al. B-1 cells and concomitant immunity in Ehrlich tumor progression. **Immunobiology**, 2014; 219: 357-366.

BONAMIN, L. V.; ENDLER, P. C. Animal models for studying homeopathy and high dilutions: Conceptual critical review. **Homeopathy**, 2009; 99: 37-50.

BONAMIN, L. V. **Signal and Images: contributions and contradictions about high dilution research**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

BORTONCELLO, B. P.; ALMEIDA, F. B.; PERES, A. Células natural killer e seu potencial na imunoterapia contra o câncer. **Ciência em Movimento**, 2013; 30.

BRUNINI, C. R. D.; GIORGI, M. S. **Matéria médica homeopática interpretada**. 1. ed. Belo Horizonte: Robe, 2010.

DEMARQUE, D. et al. **Farmacologia e matéria médica homeopática**. 3. ed. França: Organon, 2003.

ENDLER, P. C. et al. Repetitions of fundamental research models for homeopathically prepared dilutions beyond 10^{-23} : a bibliometric study. **Homeopathy**, 2010; 99: 25-36.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer. **Cell**, 2000; 100: 57-70.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The Next Generation. **Cell**, 2011; 144: 646-667.

KHUDA-BUKHSH, A. R. et al. Modulation of signal proteins: a plausible mechanism to explain how a potentized drug Secale Cor 30C diluted beyond Avogadro's limit combats skin papilloma in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011; 2011: 12.

MACLAUGHLIN, B. W. et al. Effects of homeopathic preparations on human prostate cancer growth in cellular and animal models. **Integrative Cancer Therapy**, 2006; 5: 362–372.

MORENO, J. A. **Homeopatia metafísica repertorizada**. 2. ed. Belo Horizonte: Hipocrática Hahnemanniana, 2008. v. II.

BELLAVITE, P. et al. High-dilution effects revisited. **1 Physicochemical aspects Homeopathy**, 2014; 103: 4–21.

PATERSON, I. C. M. Homeopathy: what is it and is it of value in the care of patients with cancer? **Journal of Clinical Oncology**, 2002; 14: 250-53.

PEDALINO, C. M. V. et al. Effect of *Atropa belladonna* and *echinacea angustifolia* in homeopathic dilution on experimental peritonitis. **Homeopathy**, 2014; 93:193-198.

PORTA, C. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. **Immunobiology**, 2009; 214: 761-777.

PREETHI, KI. Induction of apoptosis of tumor cells by some potentiated homeopathic drugs: implications on mechanism of action. **Integrative Cancer Therapy**, 2012, 11:172.

RODRIGUES, A. Sistema imunológico no combate ao câncer: evasão da vigilância imunológica. **Revista Científica**, 2013. Disponível em: <<http://seicesucol.edu.br/revista/index.php/facider/article/view/28>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

SAHA, S. et al. **Calcareo carbonica induces apoptosis in cancer cells in p53-dependent manner via an immuno-modulatory circuit. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013; **13**:230.

SUNILA, E. S. et al. Dynamized preparations in cell culture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2009; **6**(2): 257-263.

VIVANCO, B. C. et al. B-1 cells promote immunosurveillance against murine melanoma in host absence of CCR5: new perspective in autologous vaccination therapy. **Immunobiology**, 2014; 2019: 845-849.