

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

**MODULAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS E
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO
PELO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO *CARBO*
*ANIMALIS IN VITRO***

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

THAYNÁ NEVES CARDOSO

SÃO PAULO
2017

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

**MODULAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS E
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO
PELO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO *CARBO*
*ANIMALIS IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof(a). Dr(a). Leoni Villano Bonamin.

THAYNÁ NEVES CARDOSO

SÃO PAULO
2017

Cardoso, Thayná Neves.

Modulação da interação entre macrófagos e células de adenocarcinoma mamário murino pelo medicamento homeopático *Carbo animalis in vitro* / Thayná Neves Cardoso. – 2017.

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

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Modelos Experimentais em Patologia e Toxicologia.

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

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Pérez Hurtado.

1. Macrófagos. 2. Homeopatia. 3. Citocinas. 4. Morfologia. 5. Oncologia. I. Bonamin, Leoni Villano (orientadora). II. Pérez Hurtado, Elizabeth Cristina (coorientadora). III. Título.

THAYNÁ NEVES CARDOSO

**MODULAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS E
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO
PELO MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO CARBO
*ANIMALIS IN VITRO***

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

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Orientadora: Prof.^a Dra. Leoni Villano Bonamin.
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof.^a Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof.^a Dra. Juliana Gimenez Amaral
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof.^a Dra. Cidéli de Paula Coelho
Universidade de Santo Amaro – UNISA

_____/_____/_____
Prof.^a Dra. Thais Fabiana Gameiro Lucas
Universidade Federal do Estado de São Paulo – UNIFESP

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho à minha família, base da minha vida e que agora está mais completa à espera do Benício

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Gilmar e Elizabeth, por estarem presentes em todos os momentos de minha vida acadêmica e pessoal, contribuindo incondicionalmente para que meus sonhos e escolhas se realizem e tornem-se possíveis. Agradeço, ainda, por sempre acreditarem em mim e serem essenciais em minha formação pessoal e profissional. Sem eles, o cumprimento de mais essa etapa da vida não seria possível.

Agradeço a meu marido e parceiro, Eric, por me apoiar em todos os momentos dessa trajetória. Sem sua colaboração, dedicação, compreensão e amor não seria possível chegar onde estou.

Aos colegas colaboradores e funcionários do Centro de Pesquisa da UNIP, que auxiliaram em toda execução do trabalho, com ideias, conselhos e boas energias, para que tudo ocorresse da melhor maneira possível. Agradeço a Fabiana Santana, Luciane Dalboni e Fabiana Konno pela ajuda, nos momentos de dúvida, e pelas orientações durante toda execução deste trabalho.

Agradeço também à Professora Elizabeth Hurtado, que me auxiliou e co-orientou com enorme paciência e dedicação, durante esses anos. Sem sua valiosa participação, a elaboração e execução deste trabalho não seria possível.

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 bolsa durante a fase inicial deste trabalho e à Universidade Paulista, pela taxa concedida para sua conclusão, após integrar o quadro docente desta instituição.

E a todos os demais, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Professora. Dra. Leoni V Bonamin, que contribuiu, de forma inenarrável, para o meu crescimento acadêmico e profissional, pela dedicação nas orientações prestadas durante a elaboração e execução do trabalho. Sem sua participação em minha trajetória, não me teria tornado a pessoa e profissional que sou hoje. Muito obrigada pela colaboração, paciência e dedicação todos esses anos.

RESUMO

Apesar do desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas, o câncer ainda é uma das doenças que mais causa mortes no mundo. Paralelamente, a redução da qualidade de vida do paciente oncológico, tanto pelo progredir da doença quanto pelos efeitos colaterais dos tratamentos convencionais, é um fato relevante. Assim sendo, as terapias complementares têm sido de grande valia no auxílio ao tratamento de pacientes oncológicos. Resultados prévios sobre o papel do medicamento homeopático *Carbo animalis* (CA) na resposta imune de camundongos portadores de tumor de Ehrlich indicaram modificações na migração de macrófagos e células B1 (progenitoras) para sítio primário do tumor, implicando em mudanças na expressão de sintomas pelos animais. Contudo, a literatura sobre esse tema é ainda rara e os mecanismos de ação envolvidos, obscuros. Neste trabalho, avaliamos parâmetros morfo-funcionais de macrófagos RAW 264.7 em co-cultura com células 4T1 (adenocarcinoma murino) após o tratamento com CA em diferentes potências (6cH, 30cH e a mistura de ambas, chamada de MIX). Assim, a morfologia, a produção de óxido nítrico e a produção de citocinas/quimiocinas (IL1- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10, IL-6, VEGF-A, TNF- α , RANTES/CCL5, GM-CSF, IL12-p40, IL12-p70, MIP-1 β /CCL4, MCP-1/CCL2) foram analisadas. A co-cultura de macrófagos e células 4T1 exibiu redução do número de células por poço, após seis horas de incubação, em comparação à monocultura de macrófagos, sugerindo que as células 4T1 provavelmente exercem papel inibitório sobre os mesmos. Esse padrão de interação foi parcialmente revertido pelo tratamento com CA 6cH. O tratamento com MIX, ao contrário, reduziu ainda mais o número de células por poço, sugerindo certa citotoxicidade. Em paralelo, notou-se aumento significativo na produção de IL12-p40 apenas nas células tratadas com CA 6cH, corroborando os resultados obtidos anteriormente *in vivo*. Os dados obtidos nesse estudo indicam a atividade imunomoduladora do CA sobre macrófagos presentes no micro-ambiente tumoral, com ênfase na produção de IL12-p40 e ainda evidenciam a importância da diluição na especificidade dos efeitos. O papel citotóxico do MIX ainda merece estudos futuros.

Palavras-Chave: Macrófagos RAW 264.7. 4T1. Homeopatia. Citocinas. Morfologia. *Carbo animalis*. Oncologia.

ABSTRACT

Despite the development of new therapeutic techniques, cancer is still a world's most deadly diseases. At the same time, quality of life of cancer patient for the progression of the disease or for the side effects of conventional treatments, is a relevant fact. In addition, complementary therapies have been of a great value in helping treatment of cancer patients. Previous results on the effect of homeopathic medicine Carbo animalis (CA) in the immune response of mice with Ehrlich tumor indicated changes in macrophage migration and B1 (progenitor) cells to the primary tumor site, implying changes in the expression of symptoms by animals. However, the literature on this subject still rare and the mechanisms of action still obscure. In this work, we evaluated morphological and functional parameters of RAW 264.7 macrophages in co-culture with cells 4T1 (murine adenocarcinoma) after treatment with CA in different potencies (6cH, 30cH and the mixture of both, called MIX). Thus, the morphology, production of nitric oxide and the production of cytokines / chemokines (IL1- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10, IL-6, VEGF-A, TNF- α , RANTES / CCL5, GM-CSF, IL12-p40, IL12-p70, MIP-1 β / CCL4, MCP-1 / CCL2) were analyzed. Co-culture of macrophages and 4T1 cells showed a reduction in the number of cells per well after six hours of incubation in compared to macrophage monoculture, suggesting that 4T1 cells probably play an inhibitory role on them. This pattern of interaction was partially reversed by treatment with CA 6cH. Treatment with MIX, reduced the number of cells per well, suggesting cytotoxicity. In parallel, a significant increase in IL12-p40 production was noted only in cells treated with CA 6cH, corroborating with the results obtained previously in vivo. The data obtained in this study indicate a immunomodulatory action on macrophages present in the tumor microenvironment, with emphasis on the production of IL-12-p40 and also evidence the importance of dilution in the specificity of the effects. The MIX's cytotoxic still deserves futures studies to be better elucidated.

Keywords: Macrophages RAW 264.7. 4T1. Homeopathy. Cytokines. Morphology. Carbo animalis. Oncology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Células fixadas em metanol, coradas por hematoxilina e eosina. Objetiva 40X. **A.** macrófagos com 6 horas de incubação em placa de cultura, **B.** macrófagos com 48 horas em placa de cultura, **C.** células 4T1 com 6h horas de incubação e **D.** células 4T1 com 48h de incubação em placa de cultura23
- Figura 2 – **(A)** expressão de pseudópodes por macrófagos; **(B)** expressão de pseudópodes por células 4t1; Tempo de 48h de incubação. Coloração por hematoxilina e eosina. as setas indicam os pseudópodes observados. Objetiva 40X.....25
- Figura 3 – Dosagem de nitrito/nitrato (óxido nítrico, em μM para 105 células) no sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e células 4T1, em diferentes tempos: 6 horas **(A)**, 48 horas **(B)**. Em ambos os casos, a correção de welch foi aplicada. Os valores estão representados por média e desvio padrão. ***ANOVA, Games-Howell, $p=0.004$, $F(6, 6.76) = 17.036$, $\eta^2 = 0.392$** . A linha reta indica o valor médio de NO para a cultura pura de macrófagos e a linha pontilhada indica o valor médio de NO para a cultura pura de células 4T125
- Figura 4 – Concentrações de **IL12(p40)** no sobrenadante (pg/ml) obtido a partir da co-cultura de macrófagos RAW 264.7 e células 4T1 tratadas com *Carbo animalis* em diferentes diluições homeopáticas. Os valores representam média e erro padrão. * ANOVA/Dunnet, **$F(4,15) = 4,04$; $p=0,02$; $\eta^2=0,519$** . Neste caso, a correção de Welch foi aplicada. A linha reta indica o valor médio de IL12p40 para a cultura pura de macrófagos e a linha pontilhada indica o valor médio de IL12p40 para a cultura pura de células 4T126
- Figura 5 – Concentrações de **IL1 alpha** no sobrenadante (pg/ml) obtido a partir da co-cultura de macrófagos RAW 264.7 e células 4T1 tratadas com *Carbo animalis* em diferentes diluições homeopáticas. Os valores representam média e erro padrão. * ANOVA/Dunnet, **$F(4,15) = 3,043$; $p=0,051$; $\eta^2=0,048$**). Neste caso, a correção de Welch foi aplicada. A linha reta indica o valor médio de IL1alfa para a cultura pura de macrófagos e a linha pontilhada – sobreposta ao eixo X – indica o valor médio de IL1alfa para a cultura pura de células 4T127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise descritiva da morfologia celular em co-culturas de macrófagos raw 264.7 e células 4t1, levando-se em conta os parâmetros: número total de células por campo, interações celulares por campo e espraio / emissão de pseudópodes (área em pixels). Os dados representam média e desvio padrão nos diferentes grupos de tratamento e porcentagem em relação ao veículo (água dinamizada). As medidas foram tomadas após 06 e 48 horas de incubação. UT = controle não tratado; MO = macrófago; DW = água dinamizada; CA = Carbo animalis; MIX = mistura de potências 6cH e 30cH24

Tabela 2 – Concentração de citocinas (pg/ml) dosadas a partir do sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 e células 4T1 tratadas com *Carbo animalis* em diferentes potências. 48 horas de incubação. *ANOVA / Dunnett para a IL12 p40, **F(4,15)=4,04; p=0,02; $\eta^2=0,519$** ; Para a IL 1 alpha, **F(4,15)= 3,043; p=0,051; $\eta^2=0,048$** ; Para IL6, **F(4,7.19)= 26,455; p=0,001; $\eta^2=0,677$** ; Para MCP-1, **F(4,15)=13,852; p= $\leq 0,001$; $\eta^2=0,787$** ; Para γ INF, **F(4, 7.27)=3,86; p=0,055; $\eta^2=0,375$** em relação ao controle não tratado (macrófago + tumor). Valores expressos em média e desvio padrão26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	10
1.1 Homeopatia e oncologia experimental	10
1.2 <i>Carbo animalis</i>	15
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	17
3 MÉTODOS.....	18
3.1 Delineamento experimental.....	18
3.2 Preparação dos medicamentos.....	18
3.3 Codificação dos frascos	19
3.4 Cultura de macrófagos peritoneais e co-cultura com células 4T1	19
3.5 Análise morfológica das células	20
3.6 Ensaio de produção de Óxido Nítrico.....	20
3.7 Avaliação da produção de citocinas, quimiocinas e VEGF	21
3.8 Análise Estatística	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Estudo morfológico descritivo das culturas celulares	22
4.2 Produção de Óxido Nítrico	25
4.3 Dosagem de citocinas	25
5 DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Homeopatia e oncologia experimental

A homeopatia é uma terapêutica estabelecida há mais de 200 anos, na Alemanha, tendo sendo incluída no Guia de Estratégias da Medicina Tradicional 2014-2023, elaborado pela Organização Mundial da Saúde (QI; KELLEY, 2014). Seu uso é oficial em países como Suíça, Itália, Índia e Brasil (BONAMIN, 2008, 2016), onde está incluída no programa de Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), com o objetivo de aumentar o acesso da população aos serviços e ações de tais práticas conforme os princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS). Desde 1999, as consultas médicas em homeopatia foram incluídas na tabela de procedimentos do SAI/SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Na Índia, o uso institucionalizado da homeopatia (aproximadamente 100.000 indianos usam-na exclusivamente como forma de tratamento) também abrange a oncologia. Dentre as clínicas especializadas existentes naquele país, destaca-se a do Dr Banerjee (*PRASANTA BANERJI HOMEOPATHIC RESEARCH FOUNDATION - PBHRF* - <http://www.pbhrfindia.org>), onde são utilizados protocolos de tratamento próprios, sendo os únicos de uso oncológico, em homeopatia, reconhecidos pelo NIH (FRENKEL, 2015).

Com relação às diretrizes de 2014-2023 da Organização Mundial de Saúde (QI; KELLEY, 2014) para a medicina tradicional (T) e práticas relacionadas à medicina complementar (CM), destaca-se a seguinte declaração da Dra. Margaret Chan, Diretora Geral da OMS: “T&CM é uma parte importante e, muitas vezes, subestimada dos cuidados de saúde. T&CM é encontrada em quase todos os países do mundo e a demanda por seus serviços vem aumentando nos últimos anos”. É nesse cenário que identificamos a importância (e urgência) da busca de informação e conhecimento sobre a homeopatia tanto no âmbito da ciência básica quanto das aplicações clínicas.

De maneira geral e por mecanismos ainda pouco conhecidos, os medicamentos homeopáticos são capazes de estimular a autorregulação dos sistemas vivos em que atuam (BELLAVITE *et al.*, 2014). Em alguns casos, tais efeitos apresentam-se como resultados biológicos, muitas vezes, sutis. Dessa forma,

estudos focados na regulação celular e molecular, sobretudo *in vitro*, têm sido muito úteis na elucidação de tais mecanismos (BONAMIN, 2017).

Recentemente foi demonstrado que alguns medicamentos homeopáticos regulam mecanismos epigenéticos de proliferação e regressão tumoral, sobretudo os relacionados ao controle da apoptose *in vitro* (MACLAUGHLIN *et al.*, 2006; SUNILA *et al.*, 2007; BELLAVITE *et al.*, 2014; ARORA; TANDON, 2014; SAHA *et al.*, 2013, 2015; MARZOTTO *et al.*, 2014; OLIOSSO *et al.*, 2014; MONDAL *et al.*, 2016; KHUDA-BUKHSH *et al.*, 2011, 2015, 2017). Tais observações oriundas de protocolos de pesquisa básica têm permitido orientar os possíveis usos clínicos desses medicamentos na oncologia.

O câncer ainda é a segunda doença que mais causa mortes hoje em dia. As neoplasias possuem diversos mecanismos que justificam sua alta letalidade. Segundo Hanahan e Weinberg (2010, 2011), 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. Além dos muitos efeitos físicos observados nos pacientes oncológicos, os quais são diretos e devastadores, a redução da qualidade de vida ocorre pelo progredir da doença e pelos efeitos colaterais dos tratamentos convencionais. Tal cenário é o principal estímulo para a adoção de práticas complementares. Nos Estados Unidos, por exemplo, aproximadamente quatro, entre nove adultos e uma, em cada dez crianças, usam algum tipo de terapia alternativa (PREETHI *et al.*, 2012).

Segundo Ramamoorthy (2015), na metade do mundo, pacientes com câncer usam, além da homeopatia, outros recursos da medicina complementar alternativa (CAM). O uso de CAM no tratamento do câncer passou de 25%, em 1970, para 49% após o ano 2000. Em um estudo clínico, Sorrentino *et al.* (2017) avaliaram os benefícios da *Arnica montana* sobre a perda de sangue pós-operatório em mulheres submetidas a mastectomia unilateral total. Segundo Mukherjee *et al.* (2013), o medicamento *Thuja occidentalis*, preparado a partir de uma das plantas mais usadas na Europa, mostrou evidências bastante convincentes de seu efeito anti-

carcinogênico em ratos portadores de carcinoma pulmonar induzido por benzopireno.

Estudos clínicos e revisões clínicas sistemáticas mostram melhora na qualidade de vida do paciente oncológico, quando tratado com medicamentos homeopáticos. Esses medicamentos contribuem para uma melhora generalizada nos quadros de dor, melhoram o ganho de peso, além de auxiliarem na recuperação pós-operatória de pacientes submetidos a cirurgias oncológicas (BAO *et al.*, 2014; BOEKHOUT *et al.*, 2006; SORRENTINO *et al.*, 2017). Em 2015, dados coletados de 133 pacientes pediátricos, em um hospital universitário, na Suíça, mostraram que 53% dessas crianças usavam algum método de terapia complementar para o tratamento de cânceres, sendo o principal método adotado a homeopatia clássica. O motivo mais frequente para a escolha de terapias complementares foi a busca da melhoria da condição geral do paciente (MAGI *et al.*, 2015). Outro estudo clínico sugere que, no tratamento de pacientes que apresentam dores articulares associadas ao tratamento de câncer de mama, com os medicamentos homeopáticos *Ruta graveolens* 5CH e *Rhus toxicodendron* 9CH, tende a diminuir a dor sentida por esses pacientes, melhorando sua qualidade de vida (KARP *et al.*, 2016).

Para que os possíveis efeitos clínicos dos medicamentos homeopáticos sejam plenamente compreendidos, pesquisas na área da oncologia experimental vêm sendo realizadas em diferentes países. Ao buscarmos, na base de dados *PubMed*, artigos relacionados ao tema, usando as palavras-chave “*homeopathy and cancer*”, encontramos 298 publicações. O primeiro artigo foi publicado no ano de 1946, por HAYES RE, intitulado “Homoeopathy and tumours: cases”. Por outro lado, um aumento considerável do número de publicações sobre o tema surgiu a partir de 2007, com 30 artigos publicados. Desde então, o número de artigos indexados sobre esse tema têm aumentado progressivamente, tanto em número quanto em qualidade metodológica, permitindo revelar alguns aspectos de seu mecanismo de ação.

Para dar sustentação lógica ao uso da homeopatia na oncologia - como se vê, sobretudo, na Índia - diversas pesquisas *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidas, com o intuito de tentar elucidar os mecanismos celulares envolvidos. Um dos pesquisadores mais ativos nessa área e com maior número de publicações indexadas sobre homeopatia e câncer é Anisur R Khuda-Bukhsh. Esse autor coleciona 145 artigos listados na base *PubMed*, uma das coleções mais ricas na

área de oncologia experimental. A seguir, encontram-se citados alguns artigos mais significativos.

O medicamento *Condurango* 30C, geralmente usado para tratar câncer esofágico, também pode melhorar a evolução de neoplasias pulmonares em ratos (SIKDAR *et al.*, 2013). O medicamento *Secale cornutum* 30C reduz o desenvolvimento do papiloma cutâneo, em ratos, por regular a expressão de oncogenes nessas células (KHUDA-BUKHSH *et al.*, 2011). Recentemente, o mesmo autor (KHUDA-BUKHSH *et al.*, 2017) demonstrou o potencial terapêutico de nosódios preparados a partir do vírus HIV. Contudo, o mecanismo exato desses efeitos ainda não é conhecido, embora a regulação epigenética de células tumorais já tenha sido demonstrada, sobretudo, por desmetilação do DNA (SAHA; KHUDA-BUKHSH, 2015; SIKDAR; KHUDA-BUKHSH, 2015). As tinturas-mãe de plantas, base para o preparo dos medicamentos homeopáticos, também são foco de estudos. Apesar de não passarem pelo processo de diluição e sucussão, seus efeitos anti-neoplásicos são descritos na literatura (MONDAL *et al.*, 2014; SAHA; KHUDA-BUKHSH, 2014).

Revisões sistemáticas recentes mostram alta reprodutibilidade de resultados e ainda consolidam 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; ENDLER, 2009; ENDLER *et al.*, 2010; BONAMIN *et al.*, 2015; BONAMIN; BELLAVITE, 2015; ENDLER *et al.*, 2015; BONAMIN, 2017). 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 desses alvos múltiplos explica as dificuldades de elucidação dos mecanismos envolvidos, o que é ainda mais crítico em relação aos pacientes oncológicos (PETERSON, 2002). Contudo, os efeitos moduladores de vias intracelulares específicas de controle do crescimento e diferenciação celular, conforme observado em estudos realizados *in vitro*, mostram claramente a ação citotóxica de tais medicamentos sobre as células tumorais, com indução de apoptose (KHUDA-BUKHSH *et al.*, 2011, 2015, 2017; MACLAUGHLIN *et al.*, 2006; BELLAVITE *et al.*, 2014; SAHA *et al.*, 2013, 2017; SUNILA *et al.*, 2007; MONDAL *et al.*, 2014; BELL *et al.*, 2014).

Notamos que modelos experimentais conduzidos *in vitro* têm dado especial contribuição para o esclarecimento dos mecanismos moleculares dos medicamentos altamente diluídos. Uma revisão sistemática feita por Waisse (2017), mostra alguns estudos relevantes realizados, na Índia, sob esse enfoque. Por exemplo, a *Terminalia chebulamais*, quando em preparações homeopáticas, reduz a cinética de crescimento de células cancerosas de carcinoma mamário (linhagens MDAMB-231 e MCF-7) conforme descrito por Wani *et al.* (2016). Também o medicamento *Psorinum* inibe a proliferação celular em células de carcinoma pulmonar da linhagem A549, interrompendo o ciclo celular e diminuindo os danos ao DNA, o que facilita a promoção de apoptose das células tumorais pela via intrínseca, ou seja, dependente da sinalização mitocondrial (Mondal *et al.*, 2016).

Dentre os medicamentos homeopáticos que apresentam ação anti-neoplásica e imuno-estimulante, destacam-se os complexos homeopáticos (CESAR *et al.*, 2009). Moreira *et al.* (2012) verificaram que o tratamento de linfócitos e de macrófagos com o complexo homeopático Canova® produziu a ativação dessas células, confirmando dados de Burbano *et al.* (2009). Além do aumento significativo dos níveis de IFN- γ e IL-5 (MOREIRA *et al.*, 2012), houve aumento da atividade fosfatase ácida nos macrófagos tratados e em seu metabolismo oxidativo, com o incremento da atividade NADPH oxidase e iNOS (LOPES *et al.*, 2006), o que impacta na produção de ROS e NO (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006). O mesmo grupo obteve, recentemente, resultados interessantes com os complexos M1 e M8, tanto na estimulação leucocitária frente a agentes infecciosos, quanto na redução da disseminação do melanoma murino (NASCIMENTO *et al.*, 2017; DE ANDRADE *et al.*, 2016). A atividade oxidativa de macrófagos também foi obtida pelo tratamento dessas células com *Mercurius solubilis* em diferentes diluições centesimais (cH), tanto em modelo *in vitro* quanto *in vivo*, administrado na água de bebida. Nesses experimentos, observou-se aumento na produção de IFN- γ e de óxido nítrico, com modulação da produção de superóxido e peróxido de hidrogênio (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Por outro lado, outros medicamentos homeopáticos clássicos também têm ação moduladora sobre macrófagos, como a *Silícea terra* (DAVENAS *et al.*, 1987), o *Antimonium crudum* (SANTANA *et al.*, 2014, 2017) e o *Zincum metallicum* (OLIVEIRA *et al.*, 2017; BONAFINI *et al.*, 2017).

Recentemente, Nogueira *et al.* (2016) demonstraram que diferentes potências homeopáticas de *Phytolacca decandra* possuem ações diferentes, não lineares,

sobre o desenvolvimento do tumor de mama murino 4T1. A *Phytolacca decandra* 30 CH foi a diluição que gerou melhores parâmetros clínicos nos camundongos e a *Phytolacca decandra* 12 CH aumentou a expressão de HER-2, estimulando estudos subsequentes. Também Carvalho (2015) mostrou que diferentes diluições centesimais de *Viscum album*, quando aplicadas alternadamente, modificam a evolução do tumor de Ehrlich em camundongos, restabelecendo a imunocompetência dos animais para níveis similares aos encontrados nos animais saudáveis. Nesse estudo, observou-se também a imunossupressão induzida pela presença do tumor de Ehrlich. Mudanças evidentes no microambiente desse tumor também foram constatadas após o tratamento dos animais com *Carcinosinum*, em potências homeopáticas altas (AMARAL, 2015). Comparando-se os dados obtidos em todos esses estudos, propõe-se que os medicamentos homeopáticos agem por mecanismos múltiplos e sistêmicos, incluindo imuno-regulação e modificações do microambiente tumoral, não apenas por citotoxicidade. Assim, entende-se que o desenvolvimento de modelos de interação celular *in vitro* pode ajudar a elucidar outros mecanismos presentes na atividade de medicamentos homeopáticos sobre o controle de neoplasias. O presente estudo está inserido nessa proposta.

1.2 Carbo animalis

Um dos medicamentos homeopáticos menos estudados na homeopatia é o *Carbo animalis* (CA), preparado a partir de couro bovino calcinado. Diz-se que Hahnemann colocava grossos pedaços de couro de boi sobre carvões acesos, até que queimassem totalmente. Esse material era prensado e, quando frio, pulverizado, resultando em um pó, que era diluído. A 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 de seu real potencial terapêutico. Assim, a atenuação de sinais e sintomas próprios de pacientes terminais, como prostração, ansiedade, desespero, depressão, distensão abdominal, epistaxe, cianose de pele, sudorese, entre outros, são descritos como parâmetros eletivos para a prescrição desse medicamento (DEMARQUE *et al.*, 2003). Segundo Hahnemann, oCA seria um medicamento para ser usado em pessoas melancólicas, desapegadas da vida e em mulheres com nó doloroso nas mamas e abdome inchado. Seu uso é destacado para tratamento de

pacientes portadores de neoplasias que tenham infiltrado inflamatório purulento (HAHNEMANN, 1935).

Segundo dados do *PRASANTA BANERJI HOMEOPATHIC RESEARCH FOUNDATION* (PBHRF - <http://www.pbhrfindia.org>), o medicamento homeopático *Carbo animalis* (CA) é citado nos protocolos indicados para o tratamento de carcinoma de esôfago, útero, *cérvix*, ovário, apêndice e cólon. Nessa instituição, os medicamentos homeopáticos são o único método de tratamento de diversas doenças, incluindo neoplasias. A PBHRF atende, em média, 3.500 pacientes oncológicos por ano, utilizando protocolos próprios.

Em estudo anterior, realizado por Cardoso (2014), demonstrou-se que animais portadores da forma ascítica do tumor de Ehrlich e tratados com CA 6cH apresentavam mudanças significativas na população leucocitária tumoral, com aumento na proporção de células T CD25+ em relação às células T totais; diminuição na razão entre células CD19+/CD19- (linfócitos B2 / demais linfócitos); aumento na razão entre células B1/B2 e aumento de células CD11b+ (fagócitos) no sítio primário do tumor, sugerindo efeito imunomodulador no microambiente tumoral. Por outro lado, os animais tratados com uma mistura de potências entre CA 6cH e CA 30cH, na proporção 1:1 (nomeado como “MIX”), apresentaram aumento no número de células CD3+ (linfócitos T) e células NK aderidas às células tumorais, bem como aumento na razão entre células CD19+/CD19- (linfócitos B2 / demais linfócitos), no sítio primário do tumor. Tal resultado ainda merece elucidação, mas inspira a continuidade dos estudos. Por outro lado, a migração de macrófagos e seu precursor (células B1) para o sítio de inoculação do tumor após o tratamento com CA 6cH foi um dos achados mais relevantes deste estudo.

Tais dados, em adição à quantidade expressiva de material científico, focado na compreensão dos mecanismos de ação, bem como nos relatos de aplicações clínicas e de ações governamentais e institucionais, ao redor do mundo, relacionados ao uso da homeopatia na oncologia, motivaram-nos a dar continuidade ao estudo desse medicamento. O objetivo deste trabalho, portanto, foi elaborar uma metodologia *in vitro*, que pudesse recriar uma parcela importante do microambiente tumoral, envolvendo a relação entre macrófagos e células neoplásicas, para o estudo de alguns de seus mecanismos.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A partir dos dados obtidos nos estudos anteriores, realizados *in vivo*, sobre os efeitos do CA no tratamento de camundongos portadores do tumor de Ehrlich, formulamos nossa atual hipótese: seria o CA, em diferentes potências homeopáticas, capaz de modificar diretamente certas funções macrofágicas, como a atividade oxidativa, a morfologia, a capacidade de fagocitose e a produção de citocinas, frente a tumores agressivos?

O objetivo deste trabalho, portanto, foi observar *in vitro* as possíveis modificações na atividade biológica de macrófagos em co-cultura com células 4T1, frente à exposição a diferentes diluições homeopáticas do medicamento *Carbo animalis*, no intuito de estabelecer os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos observados anteriormente *in vivo*.

3 MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foram utilizados sete grupos de tratamento, conforme o quadro descritivo abaixo (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição dos diferentes tratamentos e controles nas placas de cultivo

1	Macrófagos
2	4T1
3	Macrófagos + 4T1
4	Macrófagos + 4T1 + Veículo (água dinamizada)
5	Macrófagos + 4T1 + CA 6cH
6	Macrófagos + 4T1 + CA 30cH
7	Macrófagos + 4T1 + CA 6cH + 30cH (MIX)

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Preparação dos medicamentos

O *Carbo animalis* (CA), nas potências 5cH e 29cH, preparado em veículo hidro- alcoólico (álcool 30%), foi fornecido por farmácia homeopática credenciada pela ANVISA (Sensitiva®). A última diluição do medicamento foi realizada em água pura (obtida por osmose reversa) estéril e submetida ao processo de sucussão automática em braço mecânico Denise (AUTIC®), para que chegasse às potências 6cH e 30cH. Esse procedimento permite a redução da concentração de álcool em 100 vezes, o que evita possíveis efeitos citotóxicos do veículo sobre as células, durante o experimento. O controle foi feito com o veículo, água pura estéril, também submetida aos mesmos procedimentos de sucussão realizados com os medicamentos, sendo chamada de “água dinamizada”.

Todos os procedimentos de preparo e estocagem seguiram as normativas descritas na Farmacopéia Homeopática Brasileira (3ª edição) (ANVISA, 2011). Toda manipulação dos medicamentos foi feita em fluxo laminar. Antes de serem aplicados sobre as culturas celulares, os medicamentos e o veículo foram filtrados em filtro Millipore de 22 micra, para completa esterilização.

3.3 Codificação dos frascos

Antes de iniciar o estudo, os frascos dos medicamentos prontos para serem estudados, assim como o veículo, tiveram suas etiquetas trocadas por um funcionário do laboratório que não se encontrava envolvido diretamente na experimentação. As etiquetas originais e os respectivos códigos foram mantidos em envelope lacrado durante todo o ensaio e o mesmo só foi aberto após o término da análise estatística. Dessa forma, todos os ensaios foram realizados em cego.

3.4 Cultura de macrófagos peritoneais e co-cultura com células 4T1

Os macrófagos RAW 264.7 foram obtidos do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e mantidos congelados em alíquotas, em temperatura de -80°C . As células 4T1 (células de carcinoma mamário murino) foram obtidas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e mantidas congeladas em alíquotas, em temperatura de -80°C .

Após o descongelamento, as células foram expandidas em garrafas de cultura pequenas e incubadas em 3 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (R10), a 37°C , com atmosfera de 5% CO_2 . Para a realização do ensaio, os macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços, contendo uma lamínula redonda estéril no fundo de cada poço. Para isso, as células não aderentes à garrafa foram removidas com PBS e as células aderentes foram removidas com “cell scraper” em meio RPMI, sendo, em seguida, centrifugadas, contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em meio R10.

Em fluxo laminar, o plaqueamento foi feito inserindo-se 50 μL de R10, contendo 10^5 células por poço, sobre uma lamínula redonda, movendo-se horizontalmente a placa para a correta distribuição das células sobre as lamínulas. O inóculo (células 4T1) foi adicionado sobre as células aderidas, na proporção 2:, e incubado por 06 ou 48 horas. As amostras foram processadas em quadruplicata.

Em função do protocolo proposto, vários procedimentos foram feitos a partir dessa etapa: 1) o sobrenadante de cada poço foi removido e congelado a -80°C , para posterior dosagem de NO e citocinas; 2) as lamínulas foram fixadas com metanol absoluto, por 15 minutos e coradas com hematoxilina-eosina. Em seguida, o

número de células totais foi computado; 3) a morfologia das células e a interação entre elas foi analisada semi-quantitativamente.

3.5 Análise morfológica das células

Após a fixação e a coloração com eosina-hematoxilina, as lâminas foram lidas em microscópio óptico. Foram observados os seguintes padrões:

- Número total de células por campo:
 - Contamos o total de células por campo com lente objetiva de aumento 40X. Vinte campos foram analisados, por lâmina, por três observadores diferentes.
- Interação celular:
 - Outro parâmetro analisado foi a interação célula-célula, usando lente objetiva de 40X. Contamos quantas células faziam contato direto umas com as outras e quantas células estavam isoladas, sem contato com as adjacentes. Vinte campos por lâmina foram analisados por três observadores diferentes.
- Expressão de pseudópodes:
 - A expressão de pseudópodes (ou espraçamento) pelas células foi observada e quantificada automaticamente pelo software MetaMorph®, utilizando o parâmetro “área” (em pixels). Vinte campos por lâmina foram fotografados e submetidos à análise automática.

3.6 Ensaio de produção de Óxido Nítrico

Os sobrenadantes, após o descongelamento, foram transferidos para a placa de leitura de 96 poços, aos quais foi adicionado o reagente Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de nãfitil-etileno-diamina-dihidroclorito em 2,5% de ácido fosfórico) na proporção de 1:1 (v/v) com o sobrenadante. Em seguida, a placa foi lida em leitor de ELISA, a 550 nM. Os valores de leitura foram comparados com uma curva padrão de NaNO₂ (5, 10, 30, 60 µM) e os resultados foram expressos em µM de nitrito liberado por 10⁵ células.

3.7 Avaliação da produção de citocinas, quimiocinas e VEGF

Os sobrenadantes de cultura dos macrófagos e células tumorais, recolhidos após 48 horas de incubação, foram descongelados e utilizados para a dosagem de citocinas, quimiocinas e VEGF-A. A dosagem foi feita pelo método MAGPIX-Luminex®, utilizando o Kit e-Bioscience de acordo com as instruções do fabricante. O Kit inclui os sistemas de detecção dos seguintes peptídeos: IL1- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10, IL-6, VEGF-A, TNF- α , RANTES/CCL5, GM-CSF, IL12-p40, IL12-p70, MIP-1 β /CCL4, MCP-1/CCL2. As amostras foram analisadas em quadruplicada. Os resultados foram expressos em pg/ml. Amostras com quantidades abaixo do limite de detecção foram registradas como “zero”.

3.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa IBM SPSS, versão 21.0, e do programa GraphPad Prism, versão 6.0, para o Windows™. A normalidade foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e por inspeção de gráficos quartil-quartil (Q-Q *plot*). A homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste de Levene e a correção de Welch foi aplicada à ANOVA em casos de não homogeneidade. Os *outliers* foram avaliados por inspeção de *box-plots* e removidos, se necessário.

Os resultados foram avaliados por meio de ANOVA de uma via e pós-teste de Dunnett, Tukey ou Games-Howell, segundo o caso. O eta-quadrado parcial (η^2), uma medida do tamanho do efeito, também foi relatado. Esse parâmetro foi particularmente útil para variáveis, apresentando grandes valores de desvio e análises, com valores p que poderiam levar a erros de tipo I (rejeição de uma hipótese nula verdadeira) ou II (retenção de hipóteses nulas falsas).

O nível de significância, em todos os casos, foi fixado em $\alpha = 0.05$ e os gráficos foram elaborados utilizando-se o software Prism 7.0.

4 RESULTADOS

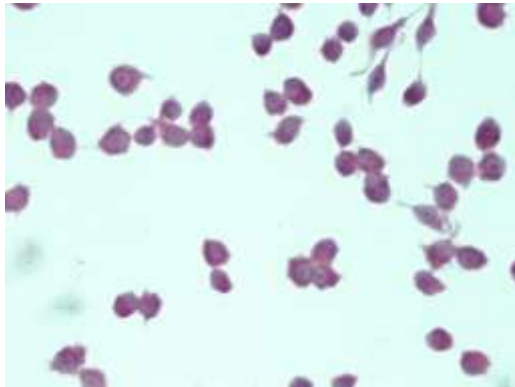
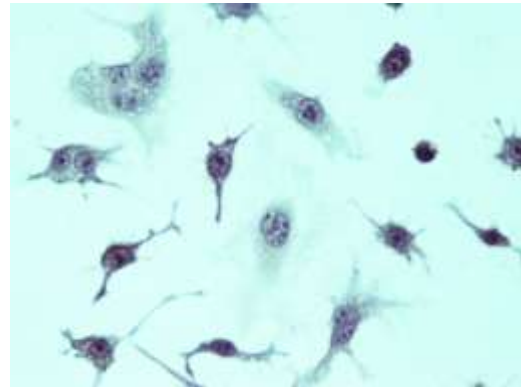
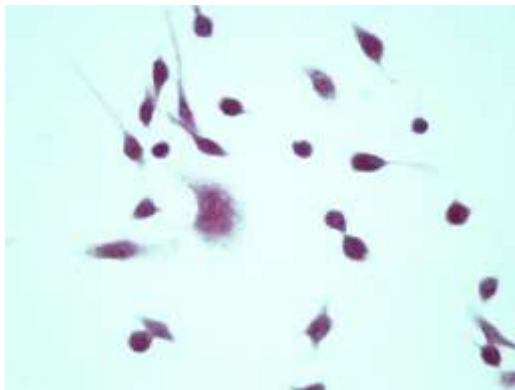
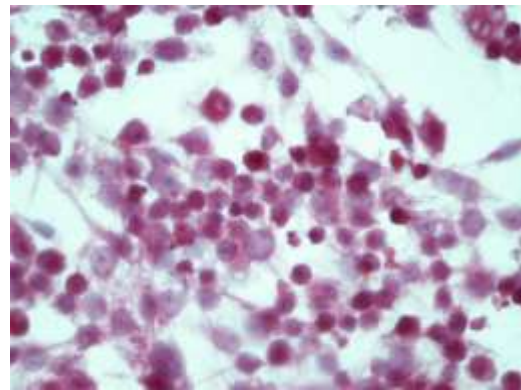
4.1 Estudo morfológico descritivo das culturas celulares

Analizando os padrões morfológicos das co-culturas por meio da coloração de hematoxilina e eosina (na placa de cultivo), verificamos que a co-cultura não tratada entre macrófagos e 4T1 com apenas seis horas de inoculação já apresentava redução no número de células total em relação à cultura simples de macrófagos, sugerindo certa competição entre as mesmas pelo consumo do meio de cultura ou inibição direta entre elas (Tabela 1). A redução marcante de células 4T1, isoladamente, também sugere certa instabilidade dessas células na adaptação ao ambiente da cultura (Tabela 1).

Curiosamente, o tratamento das culturas com água dinamizada (veículo), por si só, restabeleceu o número de células nas co-culturas, a um nível próximo ao observado na cultura simples de macrófagos. Por outro lado, uma redução expressiva do número de células somente foi observada após o tratamento com a mistura de potências de CA (MIX). Tais oscilações também se repetiram na análise das interações entre células, obedecendo às mesmas proporções. A emissão de pseudópodes (*spreading*), nas células não-tratadas, foi proporcional ao número de células presentes. Dentre os diferentes tratamentos, a emissão de um número maior de pseudópodes foi vista apenas após o tratamento com CA 6cH (Tabela 1).

Após 48 horas de interação entre as células, observou-se predomínio no crescimento de células 4T1, isoladamente, em relação aos macrófagos e às co-culturas, o que pode ser explicado pela grande velocidade de multiplicação dessas células. Da mesma forma, a frequência de interações celulares e o *spreading* também obedeceram às mesmas proporções. Nesse caso, somente as células em co-cultura tratadas com MIX apresentaram redução no número de células por campo, na ocorrência de interações celulares e na emissão de pseudópodes, em relação ao controle tratado com veículo (água dinamizada), sugerindo a permanência de efeitos citotóxicos mesmo após 48 horas de incubação. Esses dados encontram-se na Tabela 1, Figuras 1 e 2. Nessa análise, não foi possível diferenciar macrófagos e células 4T1, em função da morfologia muito parecida entre ambas, como se vê na Figura 1.

Figura 1 – Células fixadas em metanol, coradas por hematoxilina e eosina. Objetiva 40X.
A. macrófagos com 6 horas de incubação em placa de cultura, **B.** macrófagos com 48 horas em placa de cultura, **C.** células 4T1 com 6h horas de incubação e **D.** células 4T1 com 48h de incubação em placa de cultura

**A****B****C****D**

Fonte: Acervo da autora.

Tabela 1 – Análise descritiva da morfologia celular em co-culturas de macrófagos raw 264.7 e células 4t1, levando-se em conta os parâmetros: número total de células por campo, interações celulares por campo e espraçamento / emissão de pseudópodes (área em pixels). Os dados representam média e desvio padrão nos diferentes grupos de tratamento e porcentagem em relação ao veículo (água dinamizada). As medidas foram tomadas após 06 e 48 horas de incubação. UT = controle não tratado; MO = macrófago; DW = água dinamizada; CA = Carbo animalis; MIX = mistura de potências 6cH e 30cH

Análise morfológica em 06 horas de incubação

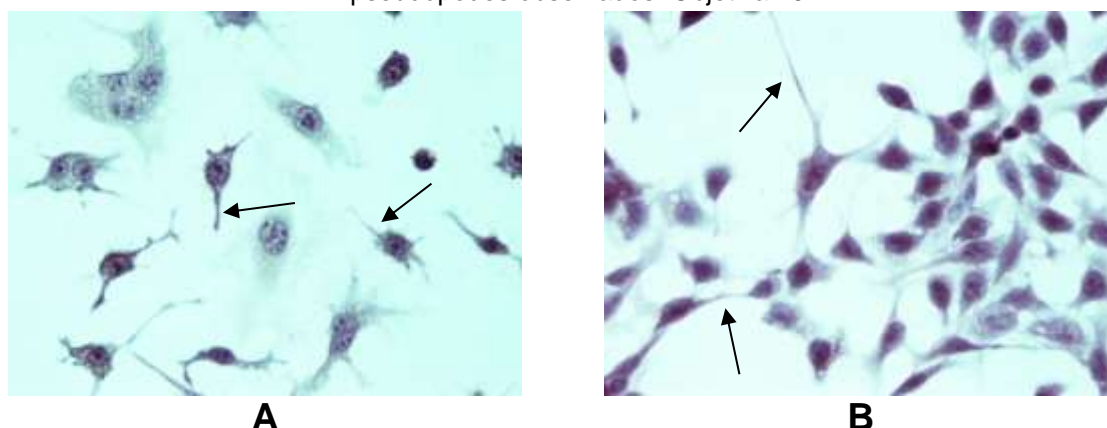
TRATAMENTOS			CÉLULAS/CAMPO	INTERAÇÃO CELULAR	SPREADING (PIXELS)
CONTROLES	UT - MO	MÉDIA/ DESVIO	28.95 ± 11.68	16.91 ± 9.10	50364.15 ± 18047.20
	UT - 4T1	MÉDIA/ DESVIO	4.11 ± 2.23	1.83 ± 2.03	8884.44 ± 4302.26
	UT - MO + 4T1	MÉDIA/ DESVIO	17.66 ± 10.22	10.50 ± 9.47	19820.30 ± 10741.10
	DW	MÉDIA/ DESVIO	25.51 ± 36.65	16.18 ± 34.95	24206.60 ± 9570.30
EXPERIMENTAIS	CA 6 cH	MÉDIA/ DESVIO	25.43 ± 15.67	14.15 ± 11.52	33708.00 ± 17079.40
		PORCENTAGEM	+0.3%	-12.5%	+39.2%
	CA 30 cH	MÉDIA/ DESVIO	20.63 ± 12.94	12.80 ± 10.50	30216.10 ± 15243.33
		PORCENTAGEM	-19.1%	-20.9%	+24,8%
	MIX	MÉDIA/ DESVIO	16,60 ± 8.82	7.76 ± 7.35	22195.85 ± 11334.00
		PORCENTAGEM	-34.9%	-52,0%	-10.2%

Análise morfológica em 48 horas de incubação

TRATAMENTOS			CÉLULAS/CAMPO	INTERAÇÃO CELULAR	SPREADING (PIXELS)
CONTROLES	UT - MO	MÉDIA/ DESVIO	6.05 ± 0.19	1.91 ± 0.79	20221.25 ± 12814.74
	UT - 4T1	MÉDIA/ DESVIO	54.98 ± 3.57	50.22 ± 4.61	115482.20 ± 54366.18
	UT - MO + 4T1	MÉDIA/ DESVIO	17.65 ± 16.68	18.52 ± 42.12	45398.72 ± 77378.50
	DW	MÉDIA/ DESVIO	28.55 ± 3.72	20.71 ± 3.90	37565.20 ± 18202.72
EXPERIMENTAIS	CA 6 cH	MÉDIA/ DESVIO	24.13 ± 0.43	18.01 ± 2.83	42100.6 ± 14548.61
		PORCENTAGEM	-15.5%	-13.0%	+12.0%
	CA 30 cH	MÉDIA/ DESVIO	17.48 ± 2.10	11.30 ± 0.62	32406.55 ± 11966.90
		PORCENTAGEM	-38.7%	-45.4%	-14.9%
	MIX	MÉDIA/ DESVIO	7.18 ± 0.14	1.51 ± 0.10	14644.25 ± 6767.47
		PORCENTAGEM	-59.3%	-92.7%	-61.0%

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 2 – (A) expressão de pseudópodes por macrófagos; (B) expressão de pseudópodes por células 4T1; Tempo de 48h de incubação. Coloração por hematoxilina e eosina. as setas indicam os pseudópodes observados. Objetiva 40X



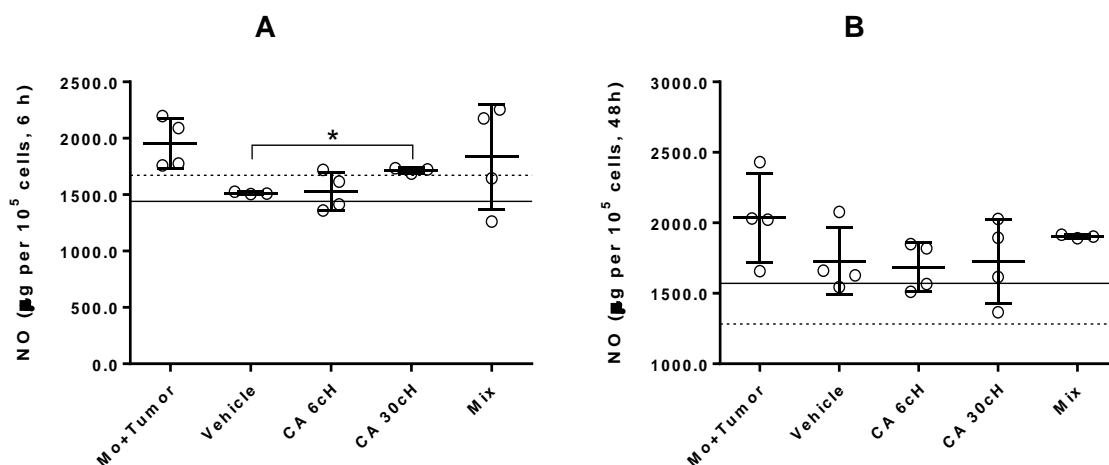
Fonte: Acervo da autora.

4.2 Produção de Óxido Nítrico

Em 6 horas, notou-se aumento transitório na produção de NO nas co-culturas tratadas com CA 30cH, em relação ao veículo [ANOVA, Games-Howell, $p=0.004$, $F(6, 6.76) = 17.036$, $\eta^2 = 0.392$], conforme representado na Figura 3.

Em 48 horas, houve aumento da variância, mas não houve significância estatística entre os tratamentos experimentais (Figura 3), exceto entre os grupos 4T1 (linha base pontilhada) e 4T1 + macrófagos (controle não tratado) [ANOVA, Games-Howell, $p=0.034$, $F(6, 16) = 2.942$, $\eta^2 = 0.525$], indicando efeito aditivo da co-cultura na produção desse mediador químico.

Figura 3 – Dosagem de nitrito/nitrato (óxido nítrico, em μM para 10^5 células) no sobrenadante de co-culturas de macrófagos RAW 264.7 e células 4T1, em diferentes tempos: 6 horas (A), 48 horas (B). Em ambos os casos, a correção de welch foi aplicada. Os valores estão representados por média e desvio padrão. *ANOVA, Games-Howell, $p=0.004$, $F(6, 6.76) = 17.036$, $\eta^2 = 0.392$. A linha reta indica o valor médio de NO para a cultura pura de macrófagos e a linha pontilhada indica o valor médio de NO para a cultura pura de células 4T1



Fonte: Acervo da autora.

4.3 Dosagem de citocinas

As co-culturas tratadas com CA 6cH mostraram aumento na concentração das citocinas IL1 alfa e IL-12(p40) no sobrenadante, após 48 horas de incubação. Tal aumento se deu em relação ao controle de co-cultura não tratada, sendo que apenas a IL12(p40) não apresentou efeito similar ao veículo, dado considerado como efeito específico do medicamento (Tabela 2, Figuras 4 e 5).

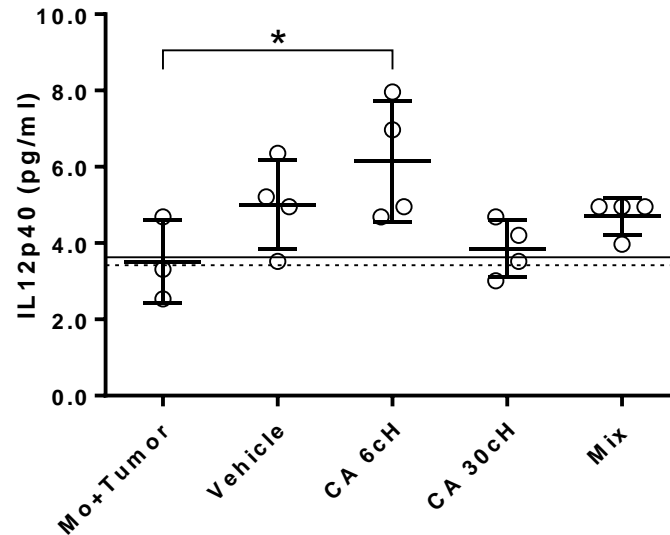
As dosagens de IL6, MCP-1 e γ INF mostraram diferenças significantes entre o controle não tratado (Macrófagos + Tumor) e os demais grupos, correspondendo a efeito inespecífico provocado pela introdução do veículo no meio de cultura (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração de citocinas (pg/ml) dosadas a partir do sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 e células 4T1 tratadas com *Carbo animalis* em diferentes potências. 48 horas de incubação. *ANOVA / Dunnett para a IL12 p40, $F(4,15)=4,04$; $p=0,02$; $\eta^2=0,519$; Para a IL 1 alfa, $F(4,15)= 3,043$; $p=0,051$; $\eta^2=0,048$; Para IL6, $F(4,7.19)= 26,455$; $p=0,001$; $\eta^2=0,677$; Para MCP-1, $F(4,15)=13,852$; $p=\leq 0,001$; $\eta^2=0,787$; Para γ INF, $F(4, 7.27)=3,86$; $p=0,055$; $\eta^2=0,375$ em relação ao controle não tratado (macrófago + tumor). Valores expressos em média e desvio padrão

Citocina/ Quimiocina		4T1+MO	MO	4T1	CA 6cH	CA 30cH	MIX	DW
TNFALFA	MÉDIA	1100,5	2219	208,12	1652,5	1188,25	1454,5	1651
	DESVIO	305,30	33,94	209,13	247,41	281,02	232,46	352,49
VEGF	MÉDIA	4,20	2,12	2,01	8,08	22,46	9,41	6,08
	DESVIO	3,23	0,16	0,12	2,78	18,83	9,13	6,10
RANTES	MÉDIA	85,72	9,945	131,48	130,75	121,73	104,11	125,76
	DESVIO	41,96	0,85	60,13	6,60	27,96	18,30	22,33
GM-CSF	MÉDIA	0,63	0,27	0,105	1,23	0,15	0,80	0,69
	DESVIO	1,06	0,26	0,13	1,16	0,20	0,96	1,04
MIP-1BETA	MÉDIA	14951	15673	7252	16340,25	15201,5	15621,25	16008,75
	DESVIO	1838,76	626,49	6561,95	642,25	1009,52	596,17	833,91
IL12(P40)	MÉDIA	3,31	3,63	3,42	6,14 *	3,85	4,70	5,00
	DESVIO	0,97	0,15	0,29	1,58	0,73	0,49	1,163
IL12(P70)	MÉDIA	3,73	3,43	2,22	5,76	3,10	4,68	4,96
	DESVIO	1,96	0,56	0,20	2,78	0,87	1,48	2,33
MCP1	MÉDIA	12492,5	11279	3583,5	14742,5	13801	14106	14296,25 *
	DESVIO	640,29	1093,18	2095,15	416,33	536,83	257,87	329,50
IL6	MÉDIA	357	68,6	54,51	831,75	834	737,25	881,50 *
	DESVIO	66,16	0	9,96	53,67	263,57	87,57	179,70
IL10	MÉDIA	872,25	451	7,765	1170,5	1084,25	1043,5	1143,5
	DESVIO	241,73	241,83	8,25	86,96	282,19	202,80	311,75
IL1BETA	MÉDIA	119,74	53,34	3,87	143,5	98,22	124,5	143,25
	DESVIO	25,39	9,75	2,78	33,60	30,58	8,58	32,35
IL1ALFA	MÉDIA	372,5	67,92	12,82	518,5*	428	461,25	508,50 *
	DESVIO	52,51	24,42	12,78	60,25	82,28	50,07	89,67
γ INF	MÉDIA	2,93	3,44	2,53	4,20	2,61	3,57	3,42 *
	DESVIO	3,31	3,55	2,57	4,09	2,56	3,54	3,2

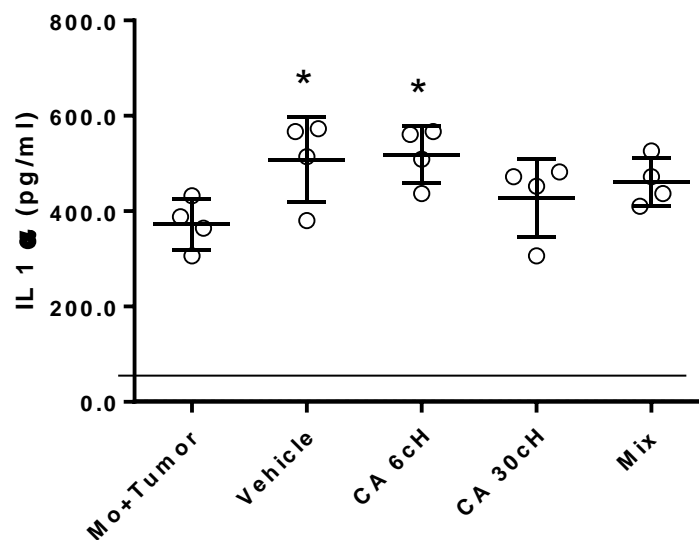
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4 – Concentrações de **IL12(p40)** no sobrenadante (pg/ml) obtido a partir da co-cultura de macrófagos RAW 264.7 e células 4T1 tratadas com *Carbo animalis* em diferentes diluições homeopáticas. Os valores representam média e erro padrão. * ANOVA/Dunnet, **F (4,15) = 4,04; p=0,02; $\eta^2=0,519$** . Neste caso, a correção de Welch foi aplicada. A linha reta indica o valor médio de IL12p40 para a cultura pura de macrófagos e a linha pontilhada indica o valor médio de IL12p40 para a cultura pura de células 4T1



Fonte: Acervo da autora.

Figura 5 – Concentrações de **IL1 alpha** no sobrenadante (pg/ml) obtido a partir da co-cultura de macrófagos RAW 264.7 e células 4T1 tratadas com *Carbo animalis* em diferentes diluições homeopáticas. Os valores representam média e erro padrão. * ANOVA/Dunnet, **F (4,15) = 3,043; p=0,051; $\eta^2=0,048$** . Neste caso, a correção de Welch foi aplicada. A linha reta indica o valor médio de IL1alfa para a cultura pura de macrófagos e a linha pontilhada – sobreposta ao eixo X – indica o valor médio de IL1alfa para a cultura pura de células 4T1



Fonte: Acervo da autora.

5 DISCUSSÃO

Como percebemos ao longo do desenvolvimento deste trabalho e na literatura científica de artigos sobre o tema *homeopatia na oncologia*, aumentou consideravelmente o interesse em compreender o real papel dos medicamentos diluídos acima do número do Avogadro na modulação da biologia tumoral, sobretudo, em que medida tais efeitos ocorrem de forma específica e diretamente sobre os tumores, modificando a expressão de oncogenes (MONDAL *et al.*, 2016; SIKDAR *et al.*, 2011; KHUDA-BUKHSH *et al.*, 2011; RAMAMOORTHY, 2015), ou indiretamente, modificando a resposta imune, sistêmica ou local, cujo foco é o balanço dos componentes do microambiente tumoral (NOGUEIRA *et al.*, 2016; AMARAL, 2015; CARVALHO, 2015).

Dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo (CARDOSO, 2014) mostram efeitos imunomoduladores do CA 6cH e CA 6cH/30cH *in vivo*, sobretudo na migração de macrófagos e células NK para o sítio de inoculação do tumor de Ehrlich. Dessa forma, os dados obtidos no presente estudo, utilizando células 4T1 *in vitro*, complementam e elucidam alguns aspectos relacionados aos efeitos do CA na relação macrófago – tumor. Os achados observados podem ser resumidos em: a) aumento transitório do *spreading* em co-culturas tratadas com CA 6cH; b) aumento transitório na produção de IL 12(p40) em co-culturas tratadas com CA 6cH; c) aumento transitório na produção de NO em co-culturas tratadas com CA 30cH; d) redução do número de células e das interações celulares nas co-culturas tratadas com CA 6cH/30cH (MIX).

Quando observamos aumento transitório de NO no grupo tratado com CA 30cH, percebemos que há uma variação muito pequena em relação aos grupos controle. Assim, ainda que haja significância estatística, a relevância biológica desse dado é discutível. Além disso, chama a atenção a atividade do veículo *per se*, água dinamizada, no caso, no sentido de aumentar o número e o *spreading* das células em co-cultura (macrófagos e células 4T1) bem como a produção de MCP-1 e das citocinas pró-inflamatórias IL6, γ INF, IL1 alfa. Para explicar os efeitos pró-inflamatórios inespecíficos, pode-se propor a hipótese da participação das nanobolhas de ar presentes nas preparações dinamizadas, que são bem descritas na literatura (DEMANGEAT, 2013, 2015) como oferta suplementar de oxigênio para as células tumorais e para os macrófagos, implicando no aumento da atividade

oxidativa celular. Tal hipótese, contudo, ainda depende de estudos específicos para sua completa elucidação, embora condizente com os dados descritos por Madera *et al.* (2015), em que a co-cultura de macrófagos e células 4T1 potencializa a resposta macrofágica a estímulos flogísticos inespecíficos, como o LPS. Nesse caso, as prováveis nanobolhas atuariam como estímulo pró-inflamatório.

Os macrófagos estão presentes na maior parte dos tecidos dos vertebrados e invertebrados. São células multifuncionais, porém, mais conhecidas por sua participação na resposta imune (AMIT *et al.*, 2016; OKABE; MEDZHITOV, 2016). Dentre as diferentes funções dos macrófagos, destacam-se a participação em tecidos associados a doenças autoimunes, a obesidade, as doenças neurodegenerativas e o câncer (EDITORIAL, 2016). Os macrófagos, entre outras células do sistema imune, produzem citocinas, que são moléculas de sinalização e que regulam uma variedade de processos imunológicos, bem como a inflamação e a reparação tecidual. Cada citocina liga-se a um receptor celular específico e inicia uma via de sinalização celular, para modificar a função das células-alvo, incluindo regulação de vários genes específicos, de acordo com o contexto celular. Dessa forma, atua como o principal meio de comunicação entre os macrófagos e seu microambiente, interferindo na migração de outras células e na eficiência do processo de fagocitose (DUQUE *et al.*, 2014).

O carcinoma mamário 4T1, por sua vez, é uma linhagem de células tumorais transplantáveis, invasiva, e que pode fazer metástases, a partir da glândula mamária, para o sangue, linfonodos, pulmão e outros órgãos, espontaneamente, o que torna essas células um modelo experimental adequado para o estudo de fatores influentes no desenvolvimento do câncer de mama humano, incluindo intervenções terapêuticas (PULASK; OSTRANDROENBERG, 2000). Recentemente, observou-se que co-culturas entre células 4T1 e macrófagos de medula óssea de camundongos (cultura primária) induziam o aumento da sensibilidade dos macrófagos a estímulos inflamatórios, resultando na maior produção de citocinas pró-inflamatórias e NO, de forma dependente de NFκ-B. Um dos mecanismos prováveis dessa regulação ocorreria pela liberação de fatores solúveis da parte das células 4T1 e pela fagocitose de exosomas produzidos por essas mesmas células (MADERA *et al.*, 2015).

No presente estudo, por meio da coloração hematoxilina-eosina e da análise morfológica de co-culturas entre macrófagos RAW 264.7 e células tumorais 4T1, foi

possível identificar vários fatores sensíveis ao CA em diferentes diluições homeopáticas. Curiosamente, os efeitos mais significativos, nessa fase dos estudos, deram-se a partir do tratamento das co-culturas com CA, preparado a partir de uma mistura de potências (6cH+30cH) denominada MIX. A redução do número de células e de suas interações, após esse tratamento, foi claramente observada em ambos os tempos observados, sugerindo fortemente uma ação citotóxica do mesmo sobre as co-culturas.

Os dados obtidos anteriormente *in vivo* mostram que camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados com MIX apresentaram aumento na incidência de sintomas clínicos (embora sem significância estatística), associada a aumento do número de células CD3+ e de células NK aderidas às células tumorais em suspensão (CARDOSO, 2014). Entende-se, portanto, que a resposta dos macrófagos ao MIX, no microambiente tumoral, poderia incluir a produção de fatores solúveis citotóxicos para o tumor, concomitantemente ao recrutamento de linfócitos T e NK. De fato, a interação exclusiva entre macrófagos e células 4T1 *in vitro* mostrou evidências de citotoxicidade, que poderão ser confirmadas, futuramente, por modelos experimentais específicos.

Desnecessário dizer que ensaios clínicos ainda são necessários, para que tal indicação se consolide, sobretudo em face à carência de estudos sobre esse medicamento e sobre os efeitos de potências homeopáticas misturadas em uma mesma preparação. Em relação a esse último item, outro trabalho desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo mostrou a potencialização de efeitos moduladores da peritonite induzida por LPS em camundongos tratados com *Atropa belladonna* e *Echinacea angustifolia*, quando em potências misturadas, em comparação com as potências simples 6cH, 30cH e 200cH (PEDALINO *et al.*, 2004). A iniciativa de misturar potências homeopáticas já havia sido proposta por Madeleine Bastide, nos anos 80, em diversos modelos experimentais na área de imunologia. Um compilado desses trabalhos clássicos encontra-se em revisão publicada recentemente (BONAMIN; BELLAVITE, 2015). Trata-se, portanto, de um campo de trabalho interessante, a ser desenvolvido clínica e experimentalmente.

Com esses achados, notamos que o MIX comporta-se como um terceiro medicamento, cujos efeitos são distintos dos efeitos observados nas diluições simples: CA 30cH e CA 6cH. Essa observação não causa surpresa e alinha-se aos achados obtidos por Nogueira (2015), de que “diferentes diluições do mesmo

medicamento possuem ações não lineares, ao contrário da crença popular de que o medicamento de diluição mais alta é mais forte”. A não linearidade das potências de CA e a não ocorrência de efeito aditivo com a mistura das mesmas reforça tal observação. A expressão de pseudópodes pelas células em co-cultura foi outro parâmetro de análise que não foi alterado pela presença do CA em potências isoladas, mas apenas na mistura entre elas. De fato, uma grande variabilidade de padrões morfológicos foi encontrada em todos os poços contendo co-culturas celulares, o que indica o marcante polimorfismo das células 4T1, embora a redução dos prolongamentos seja uma marca importante de citotoxicidade (DI *et al.*, 2014).

Diferentemente, o CA 6cH mostrou atividade imunomoduladora sobre os macrófagos, relacionada à maior produção de IL1 α e IL12(p40). Contudo, a dosagem de IL1 α também apresentou aumento estatisticamente significativo em células tratadas apenas com veículo (água dinamizada), indicando ser específico apenas o aumento de IL12(p40) deflagrado pelo CA 6 cH. O papel da IL12(p40), na biologia celular, é bem descrito na literatura, sendo a precursora da citocina ativa IL12 nos macrófagos. Yuzhalin *et al.* (2012) mostraram que a IL12 seria um importante candidata à imunoterapia para o tratamento do câncer, pois essa citocina tende a desempenhar papel central no desenvolvimento da resposta imune antitumoral. De fato, alguns estudos mostram a expressão de IL12 por macrófagos associados a tumores (YAMAGUCHI *et al.*, 2016).

Um estudo realizado por Baay *et al.* (2011), mostrou que a IL12 é normalmente produzida por macrófagos M1, promovendo resposta tumoricida e induzindo regressão tumoral em ratos. O autor indica que macrófagos polarizados para M2 no sítio tumoral estão associados ao crescimento, angiogênese e metástase dos tumores, além de menor produção de IL12. Dessa forma, a produção de IL12 por macrófagos infiltrantes de tumor é uma indicação importante de imunocompetência contra o desenvolvimento de neoplasias. Além disso, numerosos estudos relatam que a IL12 promove a destruição efetiva de células cancerosas, tanto *in vivo* como *in vitro*, e que tem atividade anti-angiogênica, inibindo a polarização de macrófagos para o perfil M2 (YUZHALLIN *et al.*, 2012). A IL12 também está associada à ativação de linfócitos T, em particular, à resposta Th1, outro aspecto importante na resposta contra tumores (ZUNDLER *et al.*, 2015). Tal tendência à resposta imune do tipo Th1 também foi observada *in vivo*, em camundongos portadores de tumor de Ehrlich, tratados com CA 6cH. Nesse caso,

observou-se aumento de células CD25+ entre a população de células T e aumento de células CD11b+ (fagócitos) no sítio tumoral, em comparação ao controle (CARDOSO, 2014).

O aumento de IL12(p40), isoladamente, em relação às demais citocinas, dá a dimensão da especificidade do CA 6cH, quando comparado a outros medicamentos testados *in vitro*. Conforme relatos recentes, substâncias altamente diluídas, preparadas homeopaticamente, atuam sobre a expressão gênica de forma extremamente pontual. Assim, somente a expressão de MCP-1 é inibida por macrófagos infectados com *L amazonensis* *in vitro* e tratados com *Antimonium crudum* 30cH. Tal especificidade não é por acaso: a MCP-1 é a principal quimiocina envolvida no recrutamento de monócitos, na resposta inflamatória crônica, evento fundamental para a manutenção do ciclo desse parasita (SANTANA *et al.*, 2017). Da mesma forma, macrófagos infectados com *E cuniculi* e tratados com *Phosphorus* 200cH *in vitro* apresentam pico transitório de RANTES (CCL5): quimiocina sinalizadora de melhor prognóstico em indivíduos imunossuprimidos acometidos por infecções oportunistas, como é o caso do *E cuniculi* (BONAMIN *et al.*, 2017). Nenhuma outra citocina ou quimiocina apresentou modificações nesse ensaio. Em Marzotto *et al.* (2016), apenas quatro genes foram expressos após tratamento de macrófagos *in vitro* com *Arnica montana* em diferentes potências homeopáticas. Todos estavam relacionados com a modulação do processo inflamatório crônico. Tais exemplos indicam uma característica marcante de ação dos medicamentos homeopáticos: a exatidão no controle da expressão gênica segundo o contexto biológico.

Tomados em conjunto, os dados obtidos neste ensaio *in vitro* são compatíveis com os resultados obtidos anteriormente *in vivo* e ainda acrescentam explicações quanto aos mecanismos celulares dos macrófagos infiltrados no tumor, sob a influência do CA 6cH. Contudo, estudos adicionais ainda são necessários.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que atividade biológica de macrófagos, em co-cultura com células 4T1, frente à exposição a diferentes diluições homeopáticas de *Carbo animalis*, apresenta mecanismos distintos, em função das diluições utilizadas. Os mecanismos mais relevantes são: a) as alterações morfológicas celulares, observadas após o tratamento das células com CA 6cH/30cH (MIX) e b) o aumento na produção de IL12 (p40) nas culturas tratadas com a CA 6cH.

Em ambos os casos, notou-se correspondência com os achados obtidos anteriormente, *in vivo*, quais sejam:

- Aumento na incidência de sintomas e na presença de células CD3+ e de células NK no microambiente tumoral, em animais tratados com CA 6cH/30cH (MIX);
- Aumento de células CD11b+ e CD25+ no microambiente tumoral, em animais tratados com CA 6cH.

O modelo experimental adotado permitiu compreender características próprias da interação macrófagos – células 4T1, além da participação dos medicamentos homeopáticos em tais co-culturas, induzindo padrões diferentes de interação em função da diluição (potência) utilizada.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. G. **Efeitos de medicamentos homeopáticos no tumor de Ehrlich em camundongos**: Uma abordagem experimental. 2015. 66 f. Tese de Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental. Universidade Paulista, São Paulo. 2015
- ARORA, S; TANDON, S. DNA fragmentation and cell cycle arrest: a hallmark of apoptosis induced by *Ruta graveolens* in human colon cancer cells. **Homeopathy**, v. 104, n. 1, p. 36-47, 2015.
- BAAY, M. et al. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, 2011.
- BAO, Y. et al. Complementary and alternative medicine for cancer pain: an overview of systematic reviews. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- BELLAVITE, P. et al. High-dilution effects revisited. 1. Physicochemical aspects. **Homeopathy**, v. 103, n. 1, p. 4-21, 2014.
- BELLAVITE, P. et al. High-dilution effects revisited. 2. Physicochemical mechanisms. **Homeopathy**, v. 103, p. 22-43, 2014.
- BISHAYEE, K.; SIKDAR, S.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Evidence of an Epigenetic Modification in Cell-cycle Arrest Caused by the Use of Ultra-highly-diluted *Gonolobus Condurango* Extract. **J Pharmacopuncture**. v. 16, n. 4, p. 7-13. 2013. doi: 10.3831/KPI.2013.16.024.
- BOEKHOUT, A. H.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. Symptoms and treatment in cancer therapy-induced early menopause. **The oncologist**, v. 11, n. 6, p. 641-654, 2006.
- BONAFINI, C; MARZOTTO, M; BELLAVITE, P. In vitro effects of Zinc in soluble and homeopathic formulations on macrophages and astrocytes. **Homeopathy**, v. 106, n. 2, p. 103-113, 2017.
- BONAMIN, L. V.; NAGAI, M. Y.; DALBONI, L. C.; PALOMBO, R. R.; CARDOSO, T. N.; CORREIA, M. S.; LALLO, M. A. *Phosphorus* modifies macrophage - *E. cuniculi* interaction in a potency-dependent basis *in vitro*. Cutting Edge Research in Homeopathy. **Annals of the 3rd Congress of HRI**. Malta, 2017. p.23, june, 2017.
- BONAMIN, L. V. A solidez da pesquisa básica em homeopatia. **Revista de Homeopatia**, v. 80, n. 1/2, p. 89-97, 2017.
- BONAMIN, L. V. **Descobrimos como a homeopatia funciona**. 73pp. 2016. ISBN 9788592161309. Disponível em: <www.biodilutions.com>. Acesso em: 15 out. 2017.

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

BONAMIN, L. V.; BELLAVITE, P. *Zincum metallicum* research: an international scientific collaboration in homeopathy. **Homeopathy: the journal of the Faculty of Homeopathy**, v. 106, n. 3, p. 133, 2017.

BONAMIN, L. V; BELLAVITE, P. Immunological models in high dilution research following M Bastide. *Homeopathy*, v. 104, n. 4, p. 263-268, 2015.

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

BRASIL. ANVISA. **Farmacopéia Homeopática Brasileira**. 3ª Ed. São Paulo. 2011.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS:** atitude de ampliação de acesso. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BURBANO, R. R. et al. Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova. **Homeopathy**, v. 98, n. 1, p. 45-48, 2009.

CARDOSO, T. N. et al. *Carbo animalis* and immune response to Ehrlich ascites tumor in mice: an experimental model. **Homeopathy**, v. 105, n. 1, p. 10-11, 2016.

CESAR, B. et al. Treatment with at homeopathic complex medication modulates mononuclear bone marrow cell differentiation. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 42, 2009.

DAVENAS, E.; POITEVIN, B.; BENVENISTE, J. Effect on mouse peritoneal macrophages of orally administered very high dilutions of silica. **European Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 313-319, 1987.

DE ANDRADE, L. F. et al. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice. **Homeopathy**, v. 105, n. 1, p. 109-118, 2016.

DE CARVALHO, A. C. **Atividade anti-neoplásica de Viscum album (L) em tumores experimentais:** Revisão crítica e estudo experimental em tumor de Ehrlich. 2015. 68 f. Tese de Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental. Universidade Paulista, São Paulo. 2015

DE OLIVEIRA, C. C.; et al. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **Journal of Infection**, v. 52, n. 6, p. 420-432, 2006.

DE OLIVEIRA, S. M. et al. Mercurius solubilis: actions on macrophages. **Homeopathy**, v. 100, n. 4, p. 228-236, 2011.

DEMANGEAT, J. Gas nanobubbles and aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization. **Homeopathy**, v. 104, n. 2, p. 101-115, 2015.

DEMANGEAT, J. Nanosized solvent superstructures in ultramolecular aqueous dilutions: twenty years' research using water proton NMR relaxation. **Homeopathy**, v. 102, n. 2, p. 87-105, 2013.

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

DI, Z *et al.* Ultra high content image analysis and phenotype profiling of 3D cultured micro-tissues. **PlosOne**, v. 9, n. 10, p. e109688, 2014.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.

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

ENDLER, P. C. *et al.* Replications of fundamental research models in ultra-high dilutions 1994 and 2015—update on a bibliometric study. **Homeopathy**, v. 104, n. 4, p. 234-245, 2015.

FRENKEL M. Is There a Role for Homeopathy in Cancer Care? Questions and Challenges. **Curr Oncol Rep**. v. 17, n. 9, p. 43. 2015. doi: 10.1007/s11912-015-0467-8. Review.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2010.

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

HANNEMANN, S. **Organon of Medicine**. B. Jain Publishers, 1935.

HAYES, R. E. Homoeopathy and tumors; cases. **Journal. National Malaria Society (US)**, v. 2, n. 5-6, p. 138, 1946.

KARP, J. C. *et al.* Treatment with *Ruta graveolens* 5CH and *Rhus toxicodendron* 9CH may reduce joint pain and stiffness linked to aromatase inhibitors in women with early breast cancer: results of a pilot observational study. **Homeopathy**, v. 105, n. 4, p. 299-308, 2016.

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 Avogadro's Limit Combats Skin Papilloma in Mice**. Evid Based Complement Alternat Med., 2011; 2011:286320. doi: 10.1093/ecam/nep084. Epub 2011 Jun 18.

KHUDA-BUKHSH, A. R.; MONDAL, J.; SHAH, R. Therapeutic potential of HIV nosode 30c as evaluated in A549 lung cancer cells. **Homeopathy**, v. 106, n. 4, p. 203-213. 2017. doi: 10.1016/j.homp.2017.09.001. Epub 2017 Oct 12.

KHUDA-BUKHSH, A. R.; SIKDAR, S. Condurango 30C Induces Epigenetic Modification of Lung Cancer-specific Tumour Suppressor Genes via Demethylation. **Forsch Komplementmed**. v. 22, n. 3, p. 172-179. 2015. doi: 10.1159/000433485.

KHUDA-BUKHSH, A. R.; SIKDAR, S. Condurango 30C induces epigenetic modification of lung cancer-specific tumour suppressor genes via demethylation. **Complementary Medicine Research**, v. 22, n. 3, p. 172-179, 2015.

LOPES, L. *et al.* Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, v. 37, n. 3, p. 277-287, 2006.

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

MADERA, L.; GREENSHIELDS, A.; COOMBS, M. R.; HOSKIN, D. W. 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells Enhance Macrophage-Mediated Innate Inflammatory Responses. **PLoS One**. v.10, n.7, e0133385. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0133385. eCollection 2015.

MAGI, T. *et al.* Use of complementary and alternative medicine in children with cancer: a study at a Swiss University Hospital. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145787, 2015.

MARZOTTO, M. *et al.* Extreme sensitivity of gene expression in human SH-SY5Y neurocytes to ultra-low doses of *Gelsemium sempervirens*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 104, 2014.

MONDAL, J. *et al.* A homeopathic nosode, Hepatitis C 30 demonstrates anticancer effect against liver cancer cells in vitro by modulating telomerase and topoisomerase II activities as also by promoting apoptosis via intrinsic mitochondrial pathway. **Journal of Integrative Medicine**, v. 14, n. 3, p. 209-218, 2016.

MONDAL, J.; SAMADDER, A.; KHUDA-BUKHSH, A,R. Psorinum 6x triggers apoptosis signals in human lung cancer cells. **Journal of integrative medicine**, v. 14, n. 2, p. 143-153, 2016.

MUKHERJEE, A.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Homeopathic Thuja 30C ameliorates benzo (a) pyrene–induced DNA damage, stress and viability of perfused lung cells of mice in vitro. **Journal of integrative medicine**, v. 11, n. 6, p. 397-404, 2013.

NASCIMENTO, K. F. *et al.* M1 homeopathic complex trigger effective responses against *Leishmania (L) amazonensis* *in vivo* and *in vitro*. **Cytokine**, v. 99, p. 80-90, 2017.

NOGUEIRA, L. *et al.* *Phytolacca decandra* 30 CH dilution as an anticancer agent in murine mammary adenocarcinoma model. International **Journal of High Dilution Research**, v. 15, n. 4, 2016.

OKABE, Y; MEDZHITOV, R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. **Cell**, v. 157, n. 4, p. 832-844, 2014.

OLIOSO, D. *et al.* Effects of *Gelsemium sempervirens* L. on pathway-focused gene expression profiling in neuronal cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 153, n. 2, p. 535-539, 2014.

PEDALINO, C. M. V. *et al.* Effect of *Atropa belladonna* and *Echinacea angustifolia* in homeopathic dilution on experimental peritonitis. **Homeopathy**, v. 93, n. 4, p. 193-198, 2004.

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

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

QI, Z; KELLEY, E. The WHO traditional medicine strategy 2014–2023: a perspective. **Science**, v. 346, n. 6216, p. S5-S6, 2014.

RAMAMOORTHY, A. *et al.* Integrative oncology in Indian subcontinent: An overview. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 3, p. XE01, 2015.

SAHA, S. K.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Berberine alters epigenetic modifications, disrupts microtubule network, and modulates HPV-18 E6-E7 oncoproteins by targeting p53 in cervical cancer cell HeLa: a mechanistic study including molecular docking. **Eur J Pharmacol.** v. 744, p. 132-46. 2014. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.09.048. Epub 2014 Oct 18.

SAHA, S. K.; ROY, S.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Ultra-highly diluted plant extracts of *Hydrastis canadensis* and *Marsdenia condurango* induce epigenetic modifications and alter gene expression profiles in HeLa cells *in vitro*. **J Integr Med.** v. 13, n. 6, p. 400-11. 2015. doi: 10.1016/S2095-4964(15)60201-1.

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

SAHA, S; ROY, S; KHUDA-BUKHSH, A.R. Ultra-highly diluted plant extracts of *Hydrastis canadensis* and *Marsdenia condurango* induce epigenetic modifications and alter gene expression profiles in HeLa cells in vitro. **Journal of integrative medicine**, v. 13, n. 6, p. 400-411, 2015.

SIKDAR, S. *et al.* Post-cancer Treatment with Condurango 30C Shows Amelioration of Benzo [a] pyrene-induced Lung Cancer in Rats Through the Molecular Pathway of Caspa-se-3-mediated Apoptosis Induction: Anti-lung cancer potential of Condurango 30C in rats. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 16, n. 3, p. 11, 2013.

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

SUNILA, E. S. *et al.* Dynamized preparations in cell culture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257-263, 2009.

WAISSE, S. Efeito de ultra-diluições homeopáticas em modelos *in vitro*: revisão da literatura. **Revista de Homeopatia**, v. 80, n. 80, 2017.

WANI, K. *et al.* Evaluating the anticancer activity and nanoparticulate nature of homeopathic preparations of *Terminalia chebula*. **Homeopathy**, v. 105, n. 4, p. 318-326, 2016.

YAMAGUCHI, T. *et al.* Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. **Gastric cancer**, v. 19, n. 4, p. 1052-1065, 2016.

YUZHALLIN, A. E.; KUTIKHIN, A. G. Interleukin-12: clinical usage and molecular markers of cancer susceptibility. **Growth Factors**, v. 30, n. 3, p. 176-191, 2012.

ZUNDLER, S; NEURATH, M. F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 26, n. 5, p. 559-568, 2015.