

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ATIVIDADE ANTI-NEOPLÁSICA DE *Viscum album (L)* EM
TUMORES EXPERIMENTAIS: REVISÃO CRÍTICA E
ESTUDO EXPERIMENTAL EM TUMOR DE EHRLICH**

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

ALOISIO CUNHA DE CARVALHO

**SÃO PAULO
2015**

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ATIVIDADE ANTI-NEOPLÁSICA DE *Viscum album (L)* EM
TUMORES EXPERIMENTAIS: REVISÃO CRÍTICA E
ESTUDO EXPERIMENTAL EM TUMOR DE EHRLICH**

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

ALOISIO CUNHA DE CARVALHO

SÃO PAULO

2015

Atividade anti-neoplásica de *Viscum album L* em tumores experimentais: revisão crítica e estudo experimental em tumor de Ehrlich / Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, UNIP. Aloísio Cunha de Carvalho. 2015. p. 69

Viscum album L.; revisão de literatura; modelos experimentais; drogas anti-neoplásicas., diluições homeopáticas, imunologia tumoral.

ALOISIO CUNHA DE CARVALHO

**ATIVIDADE ANTI-NEOPLÁSICA DE *Viscum album (L)* EM
TUMORES EXPERIMENTAIS: REVISÃO CRÍTICA E
ESTUDO EXPERIMENTAL EM TUMOR DE EHRLICH**

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

BANCA EXAMINADORA

_____ SP ____ / ____ / ____
Prof.
Universidade Paulista – UNIP

_____ - _____ SP ____ / ____ / ____
Prof.
Universidade Paulista – UNIP

_____ SP ____ / ____ / ____
Prof.
Universidade Paulista – UNIP

_____ SP ____ / ____ / ____
Prof.

_____ SP ____ / ____ / ____
Prof.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos meus familiares e aqueles que tem me acompanhado nesta experiência inusitada que é viver neste planeta.

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Leoni Villano Bonamin o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que possui sabedoria. Meu respeito e admiração pela sua serenidade e dom de ensino da ciência, com simplicidade e eficiência.

A Professora Doutora Elisabeth Perez Hurtado, pela paciência em conduzir-me, pelos caminhos da Imunologia.

Ao Professor Doutor Guilherme Xavier por mostrar-me a imensidão da enfermidade cancerígena.

A Dra. Fabiana Toshie pela facilidade no uso do Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Patologia Ambiental e Experimental.

Ao Msc Marcelo N. Sibata pelo apoio na liberação dos injetáveis Injectecenter.

Ao Serviço de Histologia através do Sr. Paulo A. Vedovato pela competência nas confecções das lâminas

As estagiárias Luana Ramos e Luciane Costa Dalboni pelo apoio na técnica da Imunohistoquímica

Ao técnico Bioterista Hilton Pereira da Silva pela ajuda em lidar com os animais.

Ao serviço de secretaria através da Srta. Cristina Rodrigues pela desenvoltura e soluções imediatas.

EPÍGRAFE

Ajude aqueles que erram; seus pés pisam o mesmo chão, e, se você tem possibilidades de corrigir, não tem o direito de censurar.

(André Luiz)

CAPÍTULO 1

ATIVIDADE ANTI-NEOPLÁSICA DE *Viscum album* (L) EM TUMORES EXPERIMENTAIS: UMA REVISÃO CRÍTICA ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF *Viscum album* (L) IN EXPERIMENTAL TUMORS: A CRITICAL REVIEW

Aloísio Cunha de Carvalho, Leoni Villano Bonamin

Universidade Paulista, Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e
Experimental. Rua Dr Bacelar, 1212 – 4o andar. CEP 04026-002 São Paulo – SP
Brasil

Correspondência: Profa. Dra. Leoni V Bonamin, PhD. Universidade Paulista,
Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental. Rua Dr
Bacelar, 1212 – 4o andar. CEP 04026-002 São Paulo – SP
Brasil. leonibonamin@unip.br

RESUMO

O uso do *Viscum album L.* (VA) no tratamento do câncer é bem conhecido. Atribui-se aos triterpenos, lectinas e viscotoxinas a sua ação anti-neoplásica, por meio da indução apoptótica e do bloqueio dos mecanismos da proliferação celular. Nesta revisão, verificou-se artigos indexados no PubMed que versassem sobre estudos experimentais entre os anos de 1983 a 2014, para avaliação crítica dos resultados obtidos, da metodologia empregada e da elucidação de seus mecanismos. Nos trabalhos realizados *in vivo* ou *in vitro* utilizando linhagens celulares de origem epitelial, mesenquimal ou melanoma, a ação do VA foi favorável à inibição da proliferação das células tumorais em 85% dos casos. A metodologia empregada nos experimentos analisados foi minimamente satisfatória do ponto de qualidade, embora se tenha notado pequena porcentagem de estudos *in vivo* randomizados e forte tendência dos trabalhos realizados *in vitro* de abandonarem o rigor do estudo em cego. Os estudos selecionados demonstram que o VA é eficaz em induzir apoptose em alguns tipos de neoplasias, sobretudo nas de origem mesenquimal, contudo, aspectos relacionados ao micro-ambiente tumoral que também poderiam ser afetados pelo uso do VA ainda são pouco estudados.

Palavras-chave: *Viscum album (L)*. Revisão de literatura; Oncologia experimental.

ABSTRACT

The use of *Viscum album* L. (VA) in the treatment of cancer is well known. It is attributed to triterpenes, lectins and viscotoxins its antineoplastic activity through induction of apoptosis and the mechanisms of cell proliferation blockage. In this review, it was found that articles indexed in PubMed versassem on experimental studies between the years 1983-2014, for critical evaluation of the results, the methodology used and the elucidation of its mechanisms. The work carried out in vivo or in vitro using cell lines of epithelial origin, mesenchymal or melanoma, the action of the VA was favorable to the inhibition of tumor cell proliferation in 85% of cases. The methodology used in the experiments was analyzed minimally satisfactory quality mark, although it has been noticed small percentage of in vivo studies and randomized strong tendency of the work done in vitro to abandon the rigor of blinded study. The selected studies show that the VA is effective in inducing apoptosis in some types of cancer, especially in the mesenchymal origin, however, aspects related to the tumor microenvironment that tqmbém could be affected by the use of VA are still poorly studied.

Keywords: *Viscum album* (L). Literature review. Experimental oncology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– RELAÇÃO GERAL DOS ESTUDOS SELECIONADOS SOBRE DIFERENTES EXTRATOS DE <i>Viscum album</i> L (VA) E SUA RELAÇÃO COM RESULTADOS OBTIDOS <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . DADOS ORGANIZADOS EM CRONOLÓGICA REGRESSIVA	18
Tabela 2 – RELAÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE A AÇÃO ANTI-TUMORAL DE <i>Viscum album in vitro</i> E ANÁLISE CRÍTICA DA METODOLOGIA	23
Tabela 3 – RELAÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE A AÇÃO ANTI-TUMORAL DE <i>Viscum album in vivo</i> E ANÁLISE DA QUALIDADE METODOLÓGICA	25

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
MÉTODO.....	12
RESULTADOS.....	14
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, revisões sistemáticas e meta análises têm mostrado evidências da eficácia clínica do uso da injeção de extratos de *Viscum album* L. (VA) como tratamento adjuvante do câncer [1,6,8] e em outras aplicações, como controle glicêmico [7- 9] e imuno-estimulação. [10-12]

A planta medicinal VA foi inicialmente utilizada para o tratamento do câncer pelos antigos povos celtas e posteriormente pelo idealizador da Antroposofia, Rudolf Steiner (1861-1925), quem considerou que o princípio ativo terapêutico teria que ser extraído em duas estações do ano: verão e inverno, para obtenção de ação terapêutica mais eficiente. [13] Ao longo das últimas décadas, diferentes formas de preparação de extratos de VA foram relatadas. [14-18] Por se tratar de planta parasita, o extrato de VA pode ser obtido a partir de diversas árvores hospedeiras, tais como o pinheiro (*Pinus*), abeto (*Abies*), amendoeira (*Prunus dulcis*), espinheiro (*Crataegus*), freixo (*Fraxinus*), macieira (*Malus*), olmo (*Ulmus*), salgueiro (*Salix*), álamo (*Populus*) ou carvalho (*Quercus*). Em todos os casos, a planta introduz o haustório no hospedeiro se perpetuando nesta condição. [13-15]

Os componentes do extrato de VA incluem flavonóides [19], triterpenos [16,21,22] lectinas, polissacarídeos, aminoácidos, viscotoxinas e vários alcalóides. [22-23] Dentre os diversos princípios ativos existentes nesta planta, são as lectinas I, II, III as mais investigadas [18,24,25,26,27,28]. Lectinas e viscotoxinas presentes no extrato de VA são apontadas como os principais agentes anti-tumorais por induzir apoptose nas células-alvo [16,26,27,28,29] Clinicamente, o impacto de suas propriedades farmacológicas se reflete no aumento de sobrevivência dos pacientes, inclusive em pacientes animais, conforme diversos estudos identificados [30,31,32,33]

Observa-se que a literatura disponível sobre o tema tem como principal foco os resultados clínicos em seres humanos e o estudo da ação pró-apoptótica e anti-proliferativa *in vitro* do extrato de VA. Contudo, outros aspectos relevantes que possam justificar sua eficácia clínica, tais como mudanças no micro-ambiente tumoral e a participação de células imunitárias, são ainda pouco explorados.

O objetivo desta revisão, portanto, é avaliar criticamente artigos indexados no sistema PubMed nos últimos 30 anos e publicados em língua inglesa que mostram os efeitos do VA em tumores experimentais, em modelos realizados *in vivo* e *in vitro*, levando-se em conta os aspectos metodológicos, os resultados obtidos e a elucidação dos mecanismos envolvidos.

MÉTODO

Foram identificados 96 artigos indexados no PubMed entre os anos de 1983 a 2014, redigidos em inglês, utilizando as seguintes palavras-chave: *Viscum album*, tumor, animal. A escolha desta base de dados e do idioma baseia-se na facilidade de acesso aos dados primários, o que pode ser útil aos leitores que desejarem aprofundar o conhecimento a partir desta revisão.

A partir das 96 referências bibliográficas recolhidas, foram aplicados os seguintes critérios de exclusão: a) Artigos de revisão; b) Estudos não experimentais ou de avaliação clínica; c) Artigos que versassem exclusivamente sobre aspectos botânicos ou de farmacognosia ou utilizavam princípios ativos sintéticos no lugar de extratos de VA como matéria prima. Todos os artigos enquadrados nos critérios de exclusão, mas que fossem dignos de nota, foram citados na introdução e/ou na discussão deste artigo, sem, contudo, entrar no quadro de avaliação sistemática.

Para cada artigo selecionado foi elaborada uma resenha, em que se destacaram parâmetros relevantes descritos sobre métodos e resultados, tanto para os experimentos realizados *in vitro* quanto *in vivo*. Para experimentos feitos *in vitro* os parâmetros de análise foram: a) quanto à metodologia: tipo de extrato usado, origem da linhagem celular estudada (epitelial, mesenquimal ou melanoma), estudo feito em cego ou não, tipos de controles, tipos de análises (proliferação, mitose, atividade oxidativa, apoptose, produção de citocinas, expressão de fatores de transcrição nuclear) b) quanto aos resultados: (citotoxicidade, proliferação celular, produção de citocinas ou outros marcadores de atividade celular) c) quanto aos mecanismos de ação identificados: (apoptose, redução na proliferação celular, outras atividades metabólicas). Para os experimentos feitos *in vivo*, observou-se: a) quanto à metodologia:(espécie animal estudada, número de animais analisados, tipo de extrato usado, protocolo de tratamento, origem da linhagem do tumor transplantado (epitelial, mesenquimal, melanoma), estudo feito em cego ou não, randomização das amostras, tipos de controles (placebo, droga de referência), outras terapias conjugadas; b) quanto aos resultados: remissão, melhora, piora e sobrevida; c) quanto aos mecanismos de ação identificados: análise do perfil de leucócitos infiltrados no tumor, expressão de marcadores fenotípicos específicos, e

outros aspectos do micro-ambiente tumoral passíveis de associação com os resultados obtidos.

Uma vez estando todas as resenhas devidamente preenchidas, os dados foram organizados em três tabelas. A Tabela 1 contém a descrição das formas farmacêuticas utilizadas, linhagem das células tumorais estudadas, dose, posologia e resultados, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. A Tabela 2 enfoca as particularidades metodológicas analisadas e os resultados obtidos a partir dos experimentos executados exclusivamente *in vitro*, e a Tabela 3 mostra a análise da metodologia empregada e os resultados nos estudos realizados exclusivamente *in vivo*.

A análise das tabelas permitiu conhecer os fatores relevantes ou não para o sucesso da terapêutica anti-tumoral com VA e dos mecanismos já conhecidos, bem como permitiu fazer uma análise crítica da metodologia empregada em tais estudos.

RESULTADOS

Dentre 95 artigos selecionados do PubMed, segundo os critérios de inclusão e exclusão descritos acima, 50 não se adequaram para as análises, conforme requisitos discriminados nos critérios de inclusão. Os 45 selecionados foram classificados em função do modelo experimental apresentado, sendo 19 experimentos realizados *in vitro* (40%), 26 realizados *in vivo* (55%), incluindo os artigos em que experimentos com ambos os modelos são descritos.

Estudos realizados In vitro

Dos 19 artigos listados feitos exclusivamente *in vitro*, 09 (47%) descreviam efeitos sobre tumores de origem epitelial (mama, pâncreas, pulmões, fígado, rins, carcinoma indiferenciado); 12 (63%) sobre tumores de origem mesenquimal (leucemia, linfoma, fibrosarcoma, sarcoma indiferenciado) e 5 (26%) sobre melanoma; também, 05 (26%) foram realizados em células não tumorais, considerando que alguns estudos usaram mais de uma linhagem celular, para fins de comparação, ou em co-culturas. A soma dessas amostras, portanto, não obrigatoriamente corresponde a 100% (Tabelas 1, 2).

Em relação à metodologia empregada, apenas 01 estudo [36] entre os 19 listados foi feito em cego (Tabela 2), sendo o único experimento *in vitro* estudado que apresentou resultado negativo. Todos os experimentos conduzidos *in vitro* tiveram como objetivo a avaliação da proliferação celular ou citotoxicidade, ou ainda a produção de citocinas e imunoglobulinas. Os efeitos dos diferentes extratos de VA foram calculados em porcentagem, a partir de diferentes concentrações de extrato (microgramas por ml), em relação às células não tratadas (controle). Alguns artigos mostravam a atividade de princípios ativos isolados a partir do extrato bruto de VA (em nanogramas por ml). Como grupo controle, todos os artigos apontavam o uso de células não tratadas como referência e apenas 01 artigo [34] mostrou o uso de controle positivo para avaliação da citotoxicidade (Tabela 2).

Quanto aos resultados, os principais efeitos observados foram: citotoxicidade por indução de apoptose ou necrose (15/19 ou 79%), mudanças na proliferação celular (3/19 ou 15%) e produção de citocinas, imunoglobulinas e atividade celular

(5/19 ou 26%); sendo que mais de um tipo de avaliação foi constatado em alguns dos artigos analisados. Em linhas gerais, 17 artigos apresentaram efeitos anti-neoplásicos, um apresentou resultado negativo e um apresentou resultado satisfatório apenas quando associado a outras substâncias anti-neoplásicas (Tabela 1).

Observando-se o conjunto dos artigos analisados, constata-se que diferentes mecanismos de ação podem ser atribuídos a diferentes princípios ativos presentes nos extratos estudados. Assim, o uso de extrato aquoso bruto ou fermentado de VA apresenta ação anti-proliferativa mais evidente do que ação citotóxica [35,36,37], sobretudo a partir de VA obtido da macieira e do carvalho (M e Q). O VA obtido de pinho (P) foi o menos ativo. A atividade citotóxica foi mais evidente quando o extrato de VA foi aplicado em conjunto com quimioterápicos citotóxicos conhecidos, em diferentes linhagens celulares [37] (Tabela 1).

Resultados mais precisos foram obtidos *in vitro* a partir de princípios ativos isolados (Tabela 1). O isolamento de triterpenos (ácido oleanólico e betulínico) a partir da fração etanólica do extrato bruto permitiu a observação de citotoxicidade dose-dependente de células de melanoma B16, mesmo sem a associação com quimioterápicos ou outras drogas. Nas concentrações mais altas, essa citotoxicidade era atribuída também à necrose e não apenas à apoptose das células tumorais [34]. O mesmo efeito foi observado em células de outras linhagens, como células leucêmicas e carcinomas, como descrito por Jung *et al.*, 2004.[29]

A lectina I isolada do extrato aquoso induziu apoptose por estimulação de endonucleases em diferentes linhagens de células tumorais e não tumorais [38,39,40], além de efeitos imuno-estimulantes [24,25]. Por outro lado, viscotoxinas isoladas a partir do extrato etanólico do VA apresentam ação essencialmente citotóxica, por indução de apoptose ou aumento de sensibilidade às células NK [28,42]. Embora a exposição ao calor seja capaz de reduzir tal atividade, a fermentação prévia do extrato mostrou ser um recurso eficiente para a preservação da atividade das viscotoxinas [18,41]. Também a aglutinina I mostrou-se capaz de induzir apoptose em neutrófilos humanos não tumorais [27,43] (Tabela 1).

Estudos realizados In vivo

Dentre os 26 artigos realizados exclusivamente *in vivo*, observou-se que 12 (46%) estudos utilizaram tumor epitelial como modelo, 13 (50%) usaram tumores mesenquimais e 8 (30%) usaram melanoma, considerando que alguns estudos referem-se a mais de um tipo de tumor. Um estudo teve como foco a atividade de neutrófilos não tumorais [26]. Dentre as espécies estudadas, 21 estudos utilizaram apenas camundongos, 01 estudo utilizou camundongos e ratos [45] 02 estudos utilizaram apenas ratos [46,47].

A avaliação de outras terapias conjugadas ao VA foi bastante restrita: apenas 06 estudos, sendo que os demais artigos versaram sobre o uso exclusivo do VA (Tabelas 1 e 3). Nesses casos, a associação mostrou efeito sinérgico entre o extrato aquoso ou etanólico e quimioterapia ou radioterapia. A associação do extrato aquoso com terpenos derivados do próprio VA potencializa o efeito anti-angiogênico e melhora a sobrevida [14,16, 20]. Os resultados obtidos de lectina, aglutinina e ácido tritirpênico isolados são controversos, pois apresentam atividade imunomoduladora e anti-oxidantes, mas há resultado negativo sobre o crescimento tumoral em alguns casos [26,48,49]

Em relação à eficácia, 22/26 artigos (85%) relatam resultados positivos e 04/26 (15%) relatam efeitos negativos. Entende-se como resultados positivos aqueles claramente anti-tumorais: expressão de genes pró-apoptóticos, anti-angiogênese, redução do volume tumoral e de metástases, citotoxicidade mediada por células NK, aumento de sobrevida. Os piores resultados foram obtidos em 02 estudos realizados em ratos [46,47] e em outros dois realizados em camundongos portadores de tumor epitelial, cujo tratamento foi feito em associação com outros agentes [45,49] Tabelas 1 e 3. Nenhuma das pesquisas listadas foi realizada em cego. A incidência de estudos randomizados também foi pequena: apenas 02 casos declaram ter sido feitos após randomização dos animais. Contudo, não se observa correlação entre randomização e resultados positivos ou negativos. Sobre a ocorrência de efeitos adversos, o mais significativo foi descrito por Kunze *et al.*, 2000,[46] em que houve aumento no crescimento tumoral em relação ao controle (Tabela 3).

Um aspecto interessante da eficácia do VA no tratamento de tumores experimentais *in vivo* é a via de administração.[40,51,52] relatam citotoxicidade e redução de metástases após injeção sub-cutânea peri-tumoral de peptídeos isolados extraídos de extrato aquoso ou extrato aquoso bruto. Também o tratamento das células tumorais com extrato aquoso de VA antes da inoculação das mesmas mostrou redução de metástases, deixando evidente a presença de receptores nestas células a componentes presentes no extrato [23,53,55]. As vias de administração utilizadas nos trabalhos selecionados foram todas parenterais (*sc*, *ip*, *iv*, *im*), com exceção do trabalho de Lee *et al.*, 2009,[48] em que a via oral foi utilizada para o tratamento dos camundongos com lectina isolada de VA *var. colortum* (*Viscum coreano*), tendo sido observado efeito imuno-modulador, sem modificações importantes no crescimento tumoral. Dos 04 tratamentos que apresentaram resultados negativos, três foram feitos por via sub-cutânea (sendo dois em ratos) e um por via intra-venosa. Ao contrário, outros 09 artigos em que o tratamento por via sub-cutânea é descrito apresentaram efeitos anti-tumorais satisfatórios. À exceção da via oral, entende-se que as demais vias de administração são igualmente eficientes.

Quanto aos hospedeiros botânicos de origem do VA, observa-se que os animais tratados com extratos de VA obtidos do carvalho (Qu) apresentam redução do crescimento de melanomas e aumento na expressão de genes pró-apoptóticos [50,56]. Os extratos de VA obtidos da macieira (M) apresentaram efeitos importantes em camundongos inoculados com células de melanoma por via *iv*, com redução na incidência de metástases pulmonares. Aumento de sobrevivência em camundongos portadores de sarcoma induzido por metilcolantreno, tumor de Ehrlich ou linfoma de Dalton também foi observado com VA – M [11,21,55,56].

Tabela 1– RELAÇÃO GERAL DOS ESTUDOS SELECIONADOS SOBRE DIFERENTES EXTRATOS DE *Viscum album* L (VA) E SUA RELAÇÃO COM RESULTADOS OBTIDOS *in vitro* e *in vivo*. DADOS ORGANIZADOS EM CRONOLOGICA REGRESSIVA

In vitro

REF	AUTOR ANO	CONCENTRAÇÃO	FORMA DE PREPARAÇÃO	LINHAGEM CELULAR (<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>)	COMENTÁRIOS
36	Baumgartner <i>et al.</i> 2014	12.5 a 800 microgramas / ml	Extrato aquoso fermentado de VA obtido de macieira e pinus. Preparação antroposófica (verão: inverno = 5:1) Método Hischia.	Mama-HCC1143 Próstata DU-145 Pulmão NCI-H460. Adenocarcinoma de Pâncrea PATU-8902 Human metastatic melanoma - MV3	Ausência de efeito citotóxico em culturas celulares associado à ação das lectinas e viscotoxinas. R esultado negativo sobre citotoxicidade
37	Weissenstein <i>et al.</i> 2014	Viscum album (Isador M and Q ®) 0.1 -100 micrograms / ml	Extrato aquoso fermentado obtido de macieira e de carvalho em associação com quimioterápicos	Mama-HCC1937 e HCC1143 Adenocarcinoma de Pâncreas PATU-8902 Carcinoma de Prostata DU145, Carcinoma de Pulmão NCI-H460	Efeito anti-proliferativo dose-dependente sobre as linhagens PATU8902 e NCI-H460. Efeito anti-proliferativo dose-dependente associado a Gemcitabine e Doxoribicin sobre linhagens HCC 1937 e HCC 1143. Sem mudanças na citotoxicidade.
34	Strüh <i>et al.</i> 2012	Triterpenos isolados do VA (ác oleanólico e ácido betulínico) 0.1 – 30 micrograms / ml	Triterpenos isolados (livres de solventes) extraídos do VA obtido de macieira.	Melanoma B16	Citotoxicidade dose-dependente dos Triterpenos isolados. Processo bifásico: apoptose seguida de necrose. Citotox. Triterpeno
57	Park <i>et al.</i> 2012	Abnobaviscum F ® 20ug/ml	Extrato aquoso de VA obtido de Fraxinus.	Células leucêmicas K562, RPMI8266, L1210	Indução de apoptose por ativação de caspase 9. Citotox Abnoba viscum
16	Delebinski <i>et al.</i> 2012	10 a 60 micrograms / ml de ácido oleanólico de VA	Ácido oleanólico (TRITERPENO) isolado de VA obtido de macieira	Células leucêmicas humanas NALM-6 (transplantadas para camundongos)	Inibição do crescimento celular por apoptose após tratamento com triterpeno isolado Citotoxicidade por apoptose
41	Uçar <i>et al.</i> 2012	100 micrograms / ml	Extrato metanólico de VA	Glioma de rato C6	Indução da caspase 3 após pré-tratamento seguido de choque térmico. Citotoxicidade, extrato metanólico.
25	Lyu <i>et al.</i> 2010	0.1 microgramas a 1 picograma / ml	Lectina isolada de VA (var. coloratum) – viscum coreano	Caco-2 (células de intestino humano) em co-cultura com linfócitos; DC1 (célula dendrítica); DC2.4 (célula linfóide) – não tumoral	Aumento do transporte de glicose trans-epitelial e aumento na produção de IL-12 pelas células dendríticas. Produção de citocinas
24	Lyu <i>et al.</i> 2009	10 ⁻⁸ e 10 ⁻⁴ ug/mL	Lectina isolada de VA (var. coloratum) – viscum coreano	IEC-6 (célula intestinal epitelial de camundongo) e IM-9 B (linfócito B humano) em co-cultura.	Aumento de produção de IGA pelas células epiteliais. Produção de Imunoglobulinas
29	Jung <i>et al.</i> 2004	0 – 200 micrograms / ml	Acido epi-oleanoico (TRITERPENO) isolado de VA (var coloratum) – viscum coreano	Melanoma B16, Leucemia RAW 264.7, Colon 26, Carcinoma P388, Fibroblasto murino NIH-3T3, Leucemia humana THP-1 e Carcinoma humano MDA-435S	Presença de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA. Citotoxicidade com triterpeno

28	Tabiasco et al. 2002	Extrato etanólico de VA 1:5000	Viscotoxin isolada de extrato etanólico de VA obtido de <i>Robinia pseudacacia</i> .	NK Linfoma de Burkitt's, Linfoma de célula B, K562	Aumento da interação entre NK e células tumorais sem ativar as células NK diretamente. Citotoxicidade indireta
27	Lavastre et al. 2002	1000ng/ml	Agglutinin-I isolada de VA	Neutrófilos humanos – não tumoral	Indução de apoptose Citotoxicidade por apoptose
35	Maier et al. 2002	Iscador® (M, Q, P) 0.0015 a 15 micrograms / ml (M/Q) 0.003 a 30 micrograms / ml (P)	Extrato aquoso fermentado de VA obtido de macieira, pinus e carvalho.	Células tumorais CNS, Gástricas, Hematológica, Pulmonar (<i>large cells</i>), Mamária, Melanoma, Próstata, Renal, Uterina.	Concentração máxima de Iscador® M, contendo 0.75 ng / ml de lectina e Iscador® Q, contendo 1.1 ng / ml de lectina apresentaram atividade anti-proliferativa em células mamárias. ANTI-PROLIFERATIVA
43	Savoie et al. 2000	0.1 - 1000 nanograms / ml	Agglutinin-I isolada de VA	Neutrófilos Humanos – não tumoral	Indução de apoptose em concentrações de 500 a 1000 ng / ml. CITOTOX POR APOPTOSE
57	Parque et al. 1999	7 a 11 micrograms / ml 380 a 450 micrograms / ml	Extrato aquoso bruto de VA (Europeu e Coreano) aquecido em água fervente (banho-maria).	Balb 3T3 (clone A31, NÃO TUMORAL) Sarcoma Murino induzido por vírus sobre A31. Adenoma íleo cecal HCT-8 L1210 Leucemia linfocítica DLD-1 Adenoma de colo humano K 562 Leucemia Mielóide Humana.	Redução da citotoxicidade da lectina I após a decocção; preservação da citotoxicidade das viscotoxinas e alcalóides. Redução da eficiência contra tumores mais agressivos. Redução da citotoxicidade por aquecimento.
40	Yoon et al. 1999	2.5 micrograms / ml	Lectinas obtidas do extrato de VA var. <i>coloratum</i> - Coreano	Humano – U937, HL60, K562, THP-1, Jurkat, Raji, Hs578T. Murino – Colon 26, melanoma B16, 3LL, Meth-A, L1210, Yac-1, 3T3, L5178Y, L929.	Indução de apoptose mediada por endonucleases dependentes de Ca ⁺⁺ e Mg ⁺⁺ . Citotoxicidade por apoptose
58	Parque et al. 1998	10 a 550 micrograms / ml	Extrato aquoso de VA var. <i>coloratum</i> – coreano. Fermentado e tratado pelo calor.	Sarcoma murino induzido por vírus Controle: Clone A31 – células não tumorais	Ação citotóxica reduzida por aquecimento mas recuperada parcialmente pela fermentação. Citotoxicidade dependente de fermentação.
38	Männel et al. 1991	10 – 100 micrograms / ml	Lectina I isolada do extrato de VA	Células Mononucleares Humanas (cultura primária) – não tumorais	Estimulação de TNF Indução de atividade citotóxica Citotoxicidade mediada por TNF
39	Hajto et al. 1990	01 nanogram / kg, i.v de lectina I em pacientes humanos doadores de leucócitos	Lectina I isolada de VA	Leucócitos Humanos – protocolo <i>ex vivo</i> – não tumorais	Aumento de TNF, IL 1 e IL6 na cultura de leucócitos. (+ aumento da temperatura em coelhos inoculados). Produção de citocinas.
18	Ribéreau-Gayon et al. 1986	01 milligram / ml	Extrato aquoso de VA fermentado obtido de macieira e Oak	Hepatoma de Rato - HTC Leucemia Humana Molt4 Transformed 3T3 rat cells	Citotoxicidade mediada por viscotoxinas termoestáveis.

In vivo

REFER	AUTOR ANO	TIPO DE EXTRATO DOSE POSOLOGIA	LINHAGEM E SEXO DO ANIMAL	LINHAGEM CELULAR	TRATAMENTO CONJUGADO	RESULTADO
49	Facina <i>et al.</i> 2014	Viscum álbum Qu (Iscador®). Extrato aquoso. 0.1 ml VA Qu, sc, peri-tumoral, diariamente, por 19 dias.	Camundongo C57BL/6N Fêmea	Melanoma B16F10	Não	POSITIVO Expressão de genes pró-apoptóticos, indução de apoptose via Caspase 7, Card10 e inibição de CAD.
22	Stan <i>et al.</i> 2013	Extrato etanólico de Viscum M. 50 mg/kg, ip Dias alternados por 6 dias	Camundongo Swiss Fêmea	Ehrlich (CA indiferenciado)	Sim. Doxorrubicina, 2,5 mg/kg diariamente por 6 dias.	POSITIVO Viscum potencializa ação anti-neoplásica da doxorrubicina e reduz atividade anti-oxidante sistêmica.
20	Strüh <i>et al.</i> 2013	Extrato aquoso de Viscum 12ug/kg, associado a extrato triterpenóide solúvel. SC, peri-tumoral.	Camundongo C57BL/6N Macho	Melanoma B16	Sim. Extrato triterpenóide solúvel.	POSITIVO Efeito anti-angiogênico com redução do volume tumoral e necrose.
16	Delebinski <i>et al.</i> 2012	Acido Triterpênico, Lectina, Viscotoxina 3ug/kg 3x por semana por três semanas.	Camundongo C.B-17/SCID Fêmea	Leucemia humana NALM-6	Sim Extrato triterpenóide e extrato aquoso de VA	POSITIVO Combinação das duas preparações induziu expressão de caspases 8 e 9. Aumento da sobrevida em camundongos.
10	Lee <i>et al.</i> 2009	Lectina isolada de VA var coloratum. 30, 100, 300, 600ug/kg Via oral, por 4 dias.	Camundongo ICR e C57BL/6 Macho	YAC-1 Linfoma	Não.	IMUNO-MODULADOR Modulação de linfócitos, citotoxicidade de células NK (ex-vivo) e macrófagos.
59	Seifert <i>et al.</i> 2008	Extrato aquoso de VA – P e VA – A. 01, 50 e 100mg/Kg, ip, por 3 ciclos de 4 dias.	Camundongo SCID Macho	Leucemia humana NALM-6	Não.	POSITIVO Aumento da sobrevida. Indução de apoptose.
60	Céborovic <i>et al.</i> 2008	Extrato de VA em CO2 2.0 ml /kg, por dia, 7 dias de tratamento, ip.	Camundongo NMRI Machos e fêmeas	Ehrlich (CA indiferenciado)	Não.	POSITIVO Extrato volátil inclui terpenos. Redução do crescimento e maior atividade anti-oxidativa.
54	Duong <i>et al.</i> 2006	Extrato aquoso de VA – Qu (Iscador®) 20ug/dia/animal, por 7 dias	Camundongo C57BL/6 Não refere sexo	B16F1 melanoma	Não.	POSITIVO Redução do crescimento do tumor <i>in vivo</i> e aumento de IL12 <i>in vitro</i>
26	Lavastre <i>et al.</i> 2004	Aglutinina (lectina) isolada de <i>Viscum album</i> 01, 10, 100, 1000 ng/ml (ex vivo)	Camundongo CD-1 Não refere sexo	Neutrófilo NÃO TUMORAL (ex vivo)	Não.	POSITIVO Indução de apoptose e inibição da inflamação nas doses maiores (doses menores: imuno - estimulantes)
52	Yoon <i>et al.</i> 2003	Extrato aquoso de VA var coloratum e Lectina isolada 05, 100 mg, iv, por 2 dias antes da inoculação do tumor.	Camundongo Balb/c C57BL/6 CDF1 Fêmeas	Melanoma B16-BL6 Linfoma L5178Y-ML25 CA Colon 26-M3.1	Não.	POSITIVO Redução da metástase no pulmão e cólon. Ativação de NK e Macrófagos.
48	Timoshenko <i>et al.</i> 2001	Lectina isolada de VA 0.22 ng/mL 100 uL/ animal a cada 4 dias, sc.	Camundongo C3H/HeJ Fêmeas	C3L5 (CA mama murino)	IL-12	NEGATIVO Piora no crescimento tumoral e ausência de efeitos na associação com IL-12
51	Zarkovic <i>et al.</i> 2001	Extrato aquoso de VA (Isorel®) 50ug, 2x por semana por 3 semanas, s.c, peri-tumoral	Camundongo CBA/HZgr Fêmeas	CA mama murino	Não.	POSITIVO Redução de metástases, citotoxicidade no tumor tratado localmente.

21	Park <i>et al.</i> 2001	Aglutinina (lectina) isolada de <i>Viscum album</i> 10, 30 e 50 ng/animal, 3 vezes por semana, ip.	Camundongo C57BL/6 Fêmeas	Melanoma B16-BL6	Não.	POSITIVO Indução de apoptose, inibição da angiogênese.
45	Kunze <i>et al.</i> 2000	Aglutinina (lectina) isolada de <i>Viscum album</i> 1ng/kg, 2 vezes por semana, sc, em 40 uL, durante 6 a 15 meses.	Rato Wistar Fêmeas	Carcinoma de bexiga induzido por BBN	Não.	NEGATIVO A incidência de CA de bexiga não diferiu entre tratados e controle. O tamanho do tumor foi maior nos animais tratados. Não houve diferença na população de células inflamatórias infiltradas no tumor.
23	Zarkovic <i>et al.</i> 1998	Extrato aquoso de <i>Viscum album</i> (Isorel ®) e lectina isolada 0,1 ug por ml de meio de cultura. Tratamento das células tumorais antes da inoculação.	Camundongo C57BL/GoZgr Machos	Melanoma	Não.	POSITIVO Redução de metástases, tanto com extrato aquoso quanto com lectina isolada.
61	Yoon <i>et al.</i> 1998	Extrato aquoso de <i>Viscum album Coloratum</i> 01 a 100ug/animal Via oral, intra-nasal, subcutânea e i.v.	Camundongo C57BL/6 Balb/c CDF Fêmeas SPF (*)	Melanoma B16-BL6, Carcinoma de colo metastático 26-M3.1 Linfoma L5178Y-ML25	Não.	POSITIVO Inibição metastática. Ativação de células NK. Aumento na sobrevida.
46	Kunze <i>et a</i> 1998	Lectina isolada de VA. 01ng/kg, duas vezes por semana durante 15 meses.	Rato Wistar SPF (*) Fêmeas	Carcinoma de bexiga induzido por MNU	Não.	NEGATIVO A incidência de CA de bexiga não diferiu entre tratados e controle. Não houve diferença na população de células inflamatórias infiltradas no tumor.
22	Kuttan <i>et al.</i> 1997	Extrato fermentado de VA (Iscador M®) 1.66 mg/camundongo, sc.	Camundongo Swiss C57BL/6 Fêmeas	Sarcoma induzido por metilcolantreno Melanoma B16F10 para indução de metástase	Não.	POSITIVO Aumento da sobrevida em 70% e redução do crescimento tumoral e da metástase pulmonar em 92%.
62	Kuttan <i>et al.</i> 1996	Extrato aquoso de VA 5% (Iscador ®) 01mg/animal/ 2 vezes por semana por 15 semanas, ip Diluições entre 1:3 a 1:3000	Camundongo Swiss Fêmeas	Sarcoma induzido por metilcolantreno	Não.	POSITIVO Remissão do tumor entre 17 (1:3000) a 67% (1:3). 100% de sobrevida em animais tratados com diluições 1:3.
63	Yoon <i>et al.</i> 1995	Extrato aquoso de <i>Viscum album coloratum</i> 100 ug/camundongo, iv, dose única, 1 dias após a inoculação.	Camundongo C57BL/6 Balb/c CDF 1 Fêmeas	Melanoma B16-BL6, CA Colon 26-M3.1 Linfoma L5178Y-ML25	Não.	POSITIVO Inibição das metástases em baço, fígado, pulmão. Inibição da angiogênese e aumento de TNF.
11	Jurin <i>et al.</i> 1993	Extrato aquoso de VA (Isorel M ®). 15 mg/kg, sc, em 4 dias consecutivos 140 mg/kg, ip, dose única	Camundongo CBA/HZgr C57B1/GoZgr Machos e Fêmeas	Fibrosarcoma CMC-2 Induzido por metilcolantreno e transplantado	Radioterapia (RX)	POSITIVO Melhora na sobrevida mas sem cura, exceto em combinação com radioterapia.
64	Kuttan <i>et al.</i> 1992	Extrato aquoso de VA (Iscador ®) e peptídeo isolado (NSC 635089) 2.5 a 1.0 ug/kg (Iscador), via <i>i.m.</i>	Camundongo Balb/c Sexo não declarado	Tumor de Ehrlich (CA indiferenciado)	Não.	POSITIVO Macrófagos apresentaram atividade citotóxica contra o tumor <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> após tratamento com peptídeo

55	Kuttan <i>et al.</i> 1990	Extrato aquoso de VA – M 5% (Iscador M ®) 83uL/animal/cada 2 dias por 10 dias. Via <i>ip</i> ou <i>im</i> .	Camundongo Swiss Sexo não declarado	Tumor de Ehrlich Linfoma de Dalton	Não.	POSITIVO Redução da massa tumoral sem alteração da medula óssea.
53	Kuttan <i>et al.</i> 1989	Extrato aquoso de VA – M 5% (Iscador M ®) Células tumorais pré-tratadas com VA 100uL	Camundongo Swiss Fêmeas	Tumor de Ehrlich Linfoma de Dalton	Não.	POSITIVO Evidências de um receptor para os princípios ativos do VA.
50	Kuttan <i>et al.</i> 1988	10 microgramas de componente isolado, via sc, peri-tumoral	Camundongo Swiss Fêmeas	Linfoma de Dalton	Não.	POSITIVO Identificação de peptídeo ativo anti-tumoral.
44	Berger <i>et al.</i> 1983.	Iscador M e P ® <i>cum argentum</i> 0,021 ml em ratos 0,005 ml em camundongos Via <i>iv</i> .	Camundongo Swiss Fêmeas Ratos Sprague-Dawley Fêmeas	Tumor de Ehrlich Tumor de Walker 256	<i>Cetraria preparata</i>	NEGATIVO Sem alterações significativas no crescimento tumoral.

(*) ELP = Espécies livre de patógenos

Tabela 2 – RELAÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE A AÇÃO ANTI-TUMORAL DE *Viscum album in vitro* E ANÁLISE CRÍTICA DA METODOLOGIA

AUTOR ANO REFERENCIA	LINHAGEM	CEGO	CONTROLE	PARÂMETROS OBSERVADOS
2014 Baumgartner <i>et al.</i> 36	EPITELIAL MELANOMA	SIM	CÉLULAS NÃO TRATADAS	PROLIFERAÇÃO, MITOSE CITOTOXICIDADE
2014 Weissenstein <i>et al.</i> 37	EPITELIAL	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS ASSOCIAÇÃO COM DIFERENTES QUIMIOTERÁPICOS	PROLIFERAÇÃO, MITOSE CITOTOXICIDADE (APOPTOSE E NECROSE)
2012 Strüh <i>et al.</i> 34	MELANOMA	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS SAUROSPORINE AS POSITIVE CONTROL	PROLIFERAÇÃO FRAGMENTAÇÃO DE DNA APOTOSE E NECROSE método Anexina V-PI
2012 Park <i>et al.</i> 36	MESENQUIMAL	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	APOPTOSE Expressão de fator de Transcrição Nuclear
2012 Delebinski <i>et al.</i> 61	MESENQUIMAL	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	PROLIFERAÇÃO APOPTOSE
2012 Uçar <i>et al.</i> 41	EPITELIAL	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	APOPTOSE Identificação CASPASE 9
2010 Lyu <i>et al.</i> 25	Co-Cultura de epitélio e cél. Dendrítica	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ATIVIDADE METABÓLICA
2009 Lyu <i>et al.</i> 24	Co-Cultura de epitélio e LB	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	PRODUÇÃO DE CITOCINA E IMUNOGLOBULINA
2004 Jung <i>et al.</i> 29	EPITELIAL, MESENQUIMAL MELANOMA	NÃO	NÃO REFERE	CITOTOXIDADE FRAGMENTAÇÃO DE DNA MORFOLOGIA - APOPTOSE
2002 Tabiasco <i>et al.</i> 28	MESENQUIMAL E CÉLULAS NK	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	CITOTOXIDADE DE CÉLULAS NK
2002 Lavastre <i>et al.</i> 27	Neutrófilos não tumorais	NÃO	PBS CÉLULAS NÃO TRATADAS	APOPTOSE
2002 Maier <i>et al.</i> 35	MELANOMA E EPITELIAL	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	PROLIFERAÇÃO
2000 Savoie <i>et al.</i> 43	Neutrófilos não tumorais	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	APOPTOSE
1999 Park <i>et al.</i> 57	EPITELIAL MESENQUIMAL cél. não tumorais	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	CITOTOXIDADE
1999 Yoon <i>et al.</i> 58	EPITELIAL MESENQUIMAL MELANOMA	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	APOPTOSE Identificação de endonucleases Ca++ e Mg ++ dependentes

1998 Parque <i>et al.</i> 58	MESENQUIMAL	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	CITOTOXIDADE
1991 Männel <i>et al.</i> 38	Leucócito humano não tumoral	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	MORTE CELULAR ATIVAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR PRODUÇÃO DE TNF
1990 Hajto <i>et al.</i> 39	Leucócito humano não tumoral	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	PRODUÇÃO DE CITOCINAS
1986 Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> 18	EPITELIAL E MESENQUIMAL	NÃO	CÉLULAS NÃO TRATADAS	CITOTOXICIDADE

Tabela 3 – RELAÇÃO DOS ESTUDOS SOBRE A AÇÃO ANTI-TUMORAL DE *Viscum album in vivo* E ANÁLISE DA QUALIDADE METODOLÓGICA

Autor Ano Referência	Espécie	Tumor	Cego	Controle	Randomização	Número animais/grupo	Efeito adverso
Facina <i>et al.</i> , 2014 49	CAM	Melanoma	Não	Água destilada	Não	6	Não refere
Stan <i>et al.</i> , 2013 22	CAM	Epitelial	Não	Veículo	Não	8	Não refere
Strüh <i>et al.</i> , 2013 20	CAM	Melanoma	Não	Extrato aquoso	Não	8-9	Inflamação e necrose
Delebinski <i>et al.</i> , 2012 16	CAM	Leucemia	Não	PBS	Não	8	Não refere
Lee <i>et al.</i> , 2009 10	CAM	Linfoma	Não	Não tratado (ex-vivo)	Não	Não declarado	N/A (ex-vivo)
Seifert <i>et al.</i> , 2008 42	CAM	Leucemia	Não	Ciclofosfamida	Não	8	Perda de peso na dose maior
Cebovic <i>et al.</i> , 2008 7	CAM	Epitelial	Não	Placebo	Não	6	Não refere
Duong <i>et al.</i> , 2006 54	CAM	Melanoma	Não	Veículo	Não	6	Não refere
Lavastre <i>et al.</i> , 2004 26	CAM	Neutrófilos não tumorais	Não	LPS	Não	Não declarado	Não refere
Yoon <i>et al.</i> , 2003 52	CAM	Epitelial e Mesenquimal	Não	Não tratado	Não	Não declarado	Não refere
Timoshenko <i>et al.</i> , 2001 48	CAM	Epitelial	Não	S/Tratam	Não	10	Nefrotóxica de e aumento de metástases
Zarcovic <i>et al.</i> , 2001 51	CAM	Epitelial	Não	PBS	Não	7	Não refere
Park <i>et al.</i> , 2001 21	CAM	Melanoma	Não	PBS	Não	10	Não refere
Kunze <i>et al.</i> , 2000 46	RATO	Epitelial	Não	S/Tratam	Sim	3	Não refere
Zarcovic <i>et al.</i> , 1998 52	CAM	Melanoma	Não	Meio de cultura	Não	5	Não refere
Yoon <i>et al.</i> , 1998 61	CAM	Epitelial Melanoma Mesenquimal	Não	PBS	Não	5	Não refere
Kunze <i>et al.</i> , 1998 47	RATO	Epitelial	Não	S/ Tratam	Não	75	Não refere
Kuttan <i>et al.</i> , 1997 22	CAM	Mesenquimal Melanoma	Não	S/Tratam	Não	15	Não refere
Kuttan <i>et al.</i> , 1996 62	CAM	Mesenquimal	Não	Salina	Sim	15	Não refere
Yoon <i>et al.</i> , 1995 63	CAM	Epitelial Melanoma Mesenquimal	Não	PBS	Não	5	Não refere
Jurin <i>et al.</i> , 1993 11	CAM	Mesenquimal	Não	Saline	Não	8-39	Não refere
Kuttan <i>et al.</i> , 1992 64	CAM	Epitelial	Não	S/Tratam	Não	Não declarado	Não refere (ex vivo)
Kuttan <i>et al.</i> , 1990 56	CAM	Epitelial Mesenquimal	Não	S/Tratam	Não	6	Não refere
Kuttan <i>et al.</i> , 1989 54	CAM	Epitelial Mesenquimal	Não	S/Tratam	Não	Não declarado	Não refere (ex vivo)
Kuttan <i>et al.</i> , 1988 51	CAM	Mesenquimal	Não	S/Tratam	Não	Não declarado	Não refere
Berger <i>et al.</i> , 1983 44	Rato e CAM	Epitelial Mesenquimal	Não	S/Tratam ou Ciclofosfamida	Não	10	Não refere

DISCUSSÃO

O *Viscum album* L é uma planta parasita que possui variados hospedeiros botânicos que podem influir na sua composição, assim como a época de colheita, por esse motivo os produtos de VA disponíveis comercialmente utilizam uma mistura de brotos de folhas frescas e frutos colhidos tanto no verão quanto no inverno, quando há aumento da concentração dos seus princípios ativos: lectinas e as viscotoxinas. As plantas utilizadas terapeuticamente são colhidas, sobretudo, do carvalho e da macieira [36]. Nesta revisão, observou-se poucos trabalhos com enfoque para a época de colheita. Ao contrário, os estudos selecionados entre 1983 e 2014 focam a importância da caracterização dos princípios ativos na atividade anti-neoplásica, por vezes, com ênfase na otimização dos efeitos por meio de associações [14,38] com vistas à prática clínica [1,3,17,31,65].

A seleção dos artigos para esta revisão priorizou a acessibilidade das informações. Muitos estudos sobre VA são apresentados em publicações independentes, de acesso restrito, em diferentes línguas, o que dificulta a consulta a dados prévios para aqueles que pretendem realizar um trabalho de pesquisa sobre o assunto. Dessa forma, os fatores de inclusão para a seleção dos artigos examinados foram centrados na disponibilidade *on-line* de textos escritos em inglês e publicados em revistas indexadas no PubMed.

Dentre os trabalhos selecionados, observamos um balanço entre os estudos realizados *in vitro* e *in vivo*. Dentre os estudos realizados *in vitro*, há um equilíbrio entre os estudos desenvolvidos em linhagens de células de origem epitelial e mesenquimal, sendo a ação pró-apoptótica ou citotóxica dos extratos de VA sobre as células tumorais o principal foco de interesse. Dessa forma, há uma deficiência de pesquisas que enfocam outros parâmetros importantes do micro-ambiente tumoral, tais como: produção de citocinas e imunoglobulinas em células leucocitárias mantidas em co-cultura com células tumorais, atividade de células dendríticas, células NK e controle da proliferação celular, sob o prisma de mecanismos epigenéticos. Atualmente, entende-se que tal abordagem seja prioritária nos estudos pré-clínicos de drogas anti-neoplásicas (66,67).

Apenas quatro autores que trabalharam desta forma em um período de vinte e cinco anos foram listados (26,29,37,40), cujos dados apontam para a atividade imuno-moduladora das lectinas e atividade anti-proliferativa das viscotoxinas obtidas do extrato fermentado. Sobre o processo de angiogênese mediado pela aglutinina I (lectina), encontramos apenas um estudo com este enfoque [43]. Os estudos envolvendo extratos orgânicos ricos em terpenos mostram clara atividade citotóxica desses princípios, independente da linhagem celular [16,30,35], suscitando novos estudos sobre a associação destes extratos com os extratos aquosos ricos em lectinas [14]. Alguns autores versaram sobre a variação coreana do *Viscum* (*Viscum album var. corolatum*), cujos resultados revelaram indução de IL1b, IL2, IL5, IL6 e TNF alfa por células dendríticas [10,25,26], aumento na atividade de macrófagos e de linfócitos B [10], bem como inibição de metástase em melanoma B16 e BL69 [53]

Nos estudos realizados *in vivo*, observa-se 85% de sucesso dos diferentes tratamentos testados, mas há um claro predomínio dos camundongos como espécie escolhida, embora houve equilíbrio entre as diferentes linhagens tumorais estudadas (epitelial, mesenquimal e melanoma). A grande maioria desses artigos apresentou resultados positivos, independente da origem das células tumorais inoculadas. Especula-se que a combinação de princípios ativos diferentes num mesmo extrato, como se observa no VA, pode gerar efeitos sinérgicos entre eles, o que poderia facilitar sua versatilidade.

O uso de camundongos tornou-se modelo quase exclusivo para o estudo de drogas anti-neoplásicas ao longo das últimas décadas. Hoje, questiona-se sobre os aspectos translacionais de tais estudos e a real possibilidade de se extrapolar os achados experimentais para situações clínicas em humanos [66,67,68]. Corroborando esta idéia, observamos nesta revisão que experimentos realizados em ratos portadores de carcinoma de bexiga apresentam resultados totalmente diversos [46,47] reforçando as evidências de que o potencial terapêutico dos extratos de VA pode ser espécie-específico. Por outro lado, estudos clínicos veterinários mostram respostas efetivas dos extratos de VA em outras espécies animais [31,32,33,34]. A maior parte dos estudos realizados exclusivamente *in vivo* não foi feita em cego, sendo que apenas poucos estudos (08/25) utilizaram amostra randomizada. Este também é outro problema observado na maioria dos estudos pré-clínicos sobre drogas anti-neoplásicas [66,67,68].

CONCLUSÃO

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* sobre a ação anti-neoplásica dos extratos aquoso e orgânico de VA demonstram que seus princípios ativos, como as viscotoxinas e os triterpenos, são eficazes em induzir apoptose em alguns tipos de neoplasias; as lectinas, por sua vez, são eficientes em produzir algum tipo de imunomodulação, contudo, outros aspectos sobre o micro-ambiente tumoral que poderiam ser também afetados com o uso do VA ainda são pouco estudados. A qualidade metodológica dos artigos analisados é suficientemente boa, mas ainda há pouca preocupação para a realização de estudos em cego e randomizados, conforme se observa na maioria das pesquisas pré-clínicas na área de oncologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Büssing A, Raak C, Ostermann T. Quality of life and related dimensions in cancer patients treated with mistletoe extract (iscador) : a meta-analysis. Evidence Based Complement Alternative Medicine (2012) 1-82012
2. Kienle GS, Kiene H. Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: A systematic review of controlled clinical studies. Integrative Cancer Therapie 2010(2) 142-157
3. Kienle GS, Glockmann A, Schienk M, Kiene H. *Viscum album* L extracts in breast and gynecological Cancers a systematic review of clinical and preclinical research. J. Exp. Clinical Cancer Research 2009 (11) 1186-1756.
4. Stein GM, Schietzel M, Büssing A. Mistletoe in immunology and the clinical (short review). Anticancer Research, 1998 (5 A) 3247-3249.
5. Werner, M. Efficacy and Safety of Mistletoe Extract in the Palliative Therapy of Patients Suffering from Pancreatic Cancer (PALM-Pan) Study no. 33-04, 2014 EudraCT no. 2014-002386-30 Kirschweg 9, 4144 Arlesheim, Switzerland
6. Mannsky P, J. Wallerstedt, D, B. Sannes, T, J. Staql, S. Johnson, L, L. Blackman, M, R. Grem, J, L. Swain, S, M. Monahan, B, P. NCCAM/NCI Phase 1 Study of Mistletoe Extract and Gemcitabine in Patients with Advanced Solid Tumours. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine 2013. 1-11 2013
7. Adaramoye O, Amanlou M, Habibi-Rezaei M, Pasalar P, Ali MM. Methanolic extract of African mistletoe (*Viscum album*) improves carbohydrates metabolism and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2012 Jun 5(6):427-33 doi: 10.1016/S1995-7645(12)60073-X.
8. Marvibaigi, M. Supriyanto, E. Amini, N. Majid, F, A, A. Jaganathan, S, K. Pre clinical and Clinical effects of mistletoe against breast cancer – BioMed Research International. 2014, 1-15
9. Itelima J U. Nyan, M A. Ogboma A I. Onwuliri, E A. Maiagwa D T. Comparative Hypoglycemic Effects of Three Nigerian Medicinal Plants, *Gongronema latifolium*, *Vernonia amygdalina* and *Viscum album* on Alloxan-Induced Diabetic Mice. Journal of Pharmacy and Biological Sciences 01/2014; 9(2):27-33
10. Lee, C, H. Kim, J, K. Kim, H, Y. Park, S, M. Lee, S, M. Immunomodulating effects of Korean mistletoe lectin in vitro and in vivo. International Immunopharmacology 2009 (2) 1555-1501.
11. Jurin, M. Zarkovic, N. Herzenjak, Hié, Z. Antitumorous and Immunomodulatory Effects of the *Viscum album* L. Preparation Isorel 1993 Oncology (50) 1-6

12 Kuttan,G. Kuttan R, S Kaveri. Immunological mechanism of action of the tumor reducing peptide from mistletoe extract (NSC 635089) cellular proliferation. Cancer Letters 1992 (66) 123-130.

13 Legnani, MD. Mistletoe in Conventional Oncological Practice: Exemplary Cases. Integrative Cancer Therapies 2008 (3) 162-171

14 Delebinski CI,Twardziok M,Kleinsimon S, Hoff F, Mulsow K, Rolff J. A Natural Combination Extract of. of *Viscum album* L. Containing Both Triterpene Acids and Lectins Is Highly Effective against AML *In Vivo*. PLoS ONE 2015 10(8)

15 Overstolz A. Iscador – Mistletoe preparations in antroposophically extended cancer treatment. Editora Verlag f. Ganzheits 2003 ISBN-10:3905436078003 Germany.

16 Delebinski CI, Jaeger S, Kemnitz-Hassanin K, Henze G, Lode HN, Seifert GJ. A new development of triterpene acid containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction o apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia. Cell Prolif Aprf 2012 45(2):176-87

17 Stein G, Berg PA: Non-lectin component in a fermented extract from *Viscum album* L. grown on pines induces proliferation of lymphocytes from healthy and allergic individuals in vitro. Eur J Clin Pharmacol 1994 47 (1): 33-8

18 Ribéreau-Gayon, G., Jung M.L., Baudino,S., Sallé.G.,Beck, J.P. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells. Experientia 1986 (42), 594-599

19 Nhiem,N,X. Kiem,P,V., Minh,C,V. Kim,N. Park,S, Lee,H,Y. Kim,S,E. Kim,Y,H. Kim,S. Koh Y,S. Kim,S,H. Diarylheptanoids and Flavonoids from *Viscum album* Inhibit LPS-Stimulated Production of Pro-Inflammatory Cytokines in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. Journal of Natural Products 2013 (76) 495-502

20 Strüh,C,M, Jager,S, Kersten A, Schempp,C M. Scheffler,A Triterpenoids Amplify Anti-Tumoral Effects of Mistletoe Extracts on Murine B16.F10 Melanoma *In Vivo*. PLoS ONE 2013, 8 (4)

21 Park W-B,Lyu S-Y, Kim J-H, Choi S-H, Chung h-k, Ahn S-H, Hong S-Y, Yoon T-J, Choi –M-J. Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by Korean Mistletoe Lectin is Associated with Apoptosis and Antiangiogenesis Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. October 2001, 16(5): 439-447.

22 Kuttan,Q. Menon,L,G. Antony,S. Kuttan,R. Anticarcinogenic and antimetastatic activity of Iscador. Anti-cancer drugs 1997 (8) 815-816

23 Stan RL, Hangan AC, Dican L, Sevastre B, Hanganu D, Catoi C, Sarpataki O, Ionescu CM. Comparative study concerning mistletoe viscotoxins antitumor activity. Acta. Biol. Hung.2013 64(3):279-88

- 24 Zarkovic,N. Kalinsnik,T. Loncaric,I. Borovic,S. Mang,S. Kissel,D. Konitzer,M. Jurin,M. Grainza,S Comparison of the Effects of *Viscum album* Lectin ML-1 and Fresh Plant Extract (Isorel) on the Cell Growth *in vitro* and Tumorigenicity of Melanoma B16F10. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 1998 V.13, N.2, 121-131
- 25 Lyu.S.Y, Park,W.B., Mistletoe Lectin Modulates Intestinal Epithelial Cell-derived Cytokines and B Cell IgA Secretion. *Archives of Pharmacology Research* 2009 (32) No.3, 443-451
- 26 Lyu,S,Y. Park,W,B. Mistletoe Lectin Transport by M-Cells in Follicle-Associated Epithelium (FAE) and IL-12 Secretion in Dendritic Cells Situated below FAE *In Vitro*. *Archives of Pharmacology Research* 2010.(33) 9 1433-1441
- 27 Lavastre,V. Cavalli,H. Girard,D. Anti-Inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): Induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic *in vivo*. *Clinical & Experimental Immunology*.2004 (2) 272-278
- 28 Lavastre.V, Pelletier. M. ,Saller Reinhard.,Hostanska. K, Girard.D, Mechanisms Involved in Spontaneous and *Viscum album* Agglutinin – I- Induced Human Neutrophil Apoptosis: *Viscum album* Agglutinin –I Accelerates the Loss of Antiapoptotic Mcl-1 Expression and the Degradation of Cytoskeletal Paxillin and Vimentin Proteins Via Caspases. *The Journal of Immunology*;168: 1419-1427. 2002
- 29 Tabiasco J, Pont F, Fourmié JJ, Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 2002 May;269(10):2591-600
- 30 Jung,M,J.Yoo,Y,C.Lee,K,B. Kim,J,B.Song,K,S. Isolation of epi-Oleanolic Acid from Korean Mistletoe and Its Apoptosis-Inducing Activity in Tumor Cells. *Archives of Pharmacal Research* 2004 (27) 8, 840-844
- 31 Lefebvre GNF, Bonamin LV, Oliveira CM. Treatment of transmissible venereal tumor (tvt) in dogs with *Viscum album*. *Clínica Veterinária* 2007 n. 70, p. 78-86,.
- 32 Blostin R, Faivre C. Bénéfices du gui fermenté chez le chat après exérèse de fibrosarcome.Resultats de une étude préliminaire. *Phytotherapie* 2008 (6) 352-358
- 33 Clottu-Christien OC, Klocke P, Burger D, Straub R, Gerber V. Treatment of Clinically Diagnosed Equine Sarcoid with a Mistletoe Extract (*Viscum album austriacus*).2010 *Journal of Veterinary Internal Medicine* (34) 1483-1489
- 34 CarvalhoAC, Bonamin L, PortoE. Int..Journal High Dilution Research 2013 12 (44) XXVII GIRI Symposium, Bern Switzerland
- 35 Strüh,C,M. Jäger,S. Schemp,C,M,. Scheffler,A. Martin,S,F. A Novel Triterpene Extract from Mistletoe Induces Rapid Apoptosis in Murine B16.F10 Melanoma Cells. *Phytotherapy Research* 2012 (26) 1507-1512

- 36 Maier,G, Fiebig,H,H. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts *in vitro*. *Anti-Cancer Drugs* 2002 (13) 1-8
- 37 Baumgarther S, Flückiger KM, Schen C, Urech K. Evaluation of Preclinical Assays to Investigate an Anthroposophic Pharmaceutical Process Applied to Mistletoe (*Viscum album* L.) Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014 1-6
- 38 Weissenstein,U Kunz,M, Urech,K Baumgartner,S Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects *in vitro*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014 (1): 14-6
- 39 Männel,D.N. Becker,H. Gundt,A. Kist,A. Franz,H. Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album* . *Cancer Immunology Immunotherapy* 1991 (33) 177-182
40. Hajto,T. Hostanska,K. Frei,K. Rodorf,C. Gabius,H,J Increased Secretion of tumor Necrosis Factor, Interleukin 1, and Interleukin 6 by Human Mononuclear Cells Exposed to Beta-Galactoside-specific Lectin from Clinically Applied Mistletoe Extract. *Cancer Research* 1990 (50) 3322-3326
- 41 Yoon,T,J, Yoo,Y,C. Kang,T,B. Shimaaki,K. Song,S,K. Lee,K,H. Kim,S,H. Park,C,H. Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Letters* 1999 (136) 33-40
- 42 Seifert,G. Jesse ,P. Laengler,A. Reindl,T. Lüth,M. Lobitz, S. Henze,G. Prokop, A. Lode,HN. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Letters* (2) 218-228. 2008
- 43 Uçar,E,O. Arda,N. Aitken,A. Extract from mistletoe *Viscum album* L.; reduces Hsp27 and 14-3-3 protein expression and induces apoptosis in C6 rat glioma cells. *Genetics and Molecular Research* 2012 11 (3) 2801-2813
- 44 Savoié.A. Lavastre,V. Pelletier,M. Hajto,T. Hostanska,K. Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of *de novo* protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology* 2000 (68) 845-853.
- 45.Berger M, Schmäh L. Studies on the Tumor-inhibiting Efficacy of Iscador in Experimental Animal Tumors. *J. Cancer Research Clinical Oncology* 1983.105, 262-265.
- 46 Kunze,E. Schulz,H. Long-term administration of galactoside-specific mistletoe lectin in an animal model: no protection against N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats and no induction of a relevant local cellular immune response. *Journal Cancer Research Clinical Oncology* 2000 (126) 125-138.

- 47 Kunze.E, Shulz,H. Gabius,H,J. Inability of galactoside-specific mistletoe lectin to inhibit N-methyl-N-nitrosourea-induced tumor development in the urinary bladder of rats and to mediate a local cellular immune response after long-term administration. *J. Cancer Research Clinical Oncology* 1998 (124) 73-87 1998.
- 48 Lee,C,H. Kim,J,K. Kim,H,Y. Park,S,M. Lee,S,M Immunomodulating effects of Korean mistletoe lectin in vitro and in vivo. *International Immunopharmacology* 2009 (2) 1555-1501
- 49 Timoshenko,A.V. Lan Y. Gabius,P.K., Lala,P.K. Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin or their combination: effects on tumour growth, capillary leakage and nitric oxide (NO) production. *European Journal of Cancer* 2001 (37) 1910-1920
- 50 Facina A S, Facina G, Silva I D C G, Gonçalves G A, Almeida F A, Noronha S A A C, Noronha S M R, Nakamura, M U. *Viscum Album* Modulates Apoptotic Related Genes in Melanoma Tumor of Mice *American Journal of Molecular Biology*, 2014 4, 49-58.
- 51 Kuttan,G,. Vasudevan, D,M. Kuttan, Isolation and Identification of a tumor reducing component from Mistletoe extract (Iscador). *Cancer Letters* 1988 41, 307-314.
- 52 Zarkovic,N, Vukovic.T, Loncaric.I, Miletic,M, Zarkovic,K, Borovic,S. Cipak,A. Sabolovic,S. Konitzer,M. Mang,S. An Overview on Anticancer Activities of the *Viscum album* Extract (Isorel). *Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals*. 2001 (16) 55-62
- 53 Yoon,T,J. Yoo,Y,C. Kang,T,B. Song,S,K. Lee,K,B. Her,E. Song,S,K. KimJ,B. Antitumor Activity of the Korean Mistletoe Lectin is Attributed to Activation of Macrophages and NK Cells. *Archives of Phamacal Research*.(26) 861-867 2003.
- 54 Kuttan,G,. Vasudevan, D,M. Kuttan ,R. Presence of a receptor for the active component of Iscador in ascites fluid of tumour bearing mice. *Cancer Letters*,1989 48 223-227
- 55 Duong JP, Hayen V, Delignat S, Bayry J, Kazalchkine MD, Bruneval P, Nicoletti A. Interleukin-12 is associated with the *in vivo* anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Letters* 2006 (243) 32-37.
- 56 Kuttan,G. Vasudevan,D,M. Kuttan,R Effect of preparation from *Viscum album* on Tumor Development *in vitro* and in Mice. *Journal of Ethnopharmacology* 1990 (29) 35-41.
- 57 Park,Y,K. Do,R,B. Jang,C *Abnobaviscum* F. Apoptosis of K562 leukemia cells by a European mistletoe extract. *Oncology Report* 2012 6) 2227-2232
- 58 Parque,J,H. Hyun,C,K. Shin,H,K. Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Letters* 1999 (139) 207-213.

59. Parque, J.H. Hyun, C.K. Shin, H.K. Cytotoxicity of heat-treated Korean mistletoe. *Cancer Letters* 1998(126) 43-48.
60. Cebovic T, Spasic S, Popovic M. Cytotoxic Effects of the *Viscum album* L. Extract on Ehrlich Tumour Cells *In Vivo* . *Phytotherapy Research* 2008 (22) 1097-1103.
61. Seifert, G. Jesse ,P. Laengler, A. Reindl, T. Lüth, M. Lobitz, S. Henze, G. Prokop, A. Lode, H.N. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Letters* 2008 (2) 218-228
62. Yoon, T.J. Yoo, Y.C. Kang, T.B. Baek, T.J. Huh, C.S. Song, S.K. Lee, K.H. Azuma, I. Kimm J.B. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *International Journal of Immunopharmacology* 1998 (20) 163-172
63. Kuttan, G. Menon, G. Kuttan, R. Prevention of 20-methylcholanthrene-induced sarcoma by a mistletoe extract, Iscador. *Carcinogenesis* 1996 (17) 5 1107-1109.
64. Yoon, T.J. Yoo, Y.C. Choi, O.B. Do, M.S. Kang, T.B. Lee, S.W. Azuma, I. Kim, J.B. Inhibitory effects of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumor cells in mice. *Cancer Letters*. 1995 (97) 83-91.
65. Kuttan, G. Kuttan R, S Kaveri. Immunological mechanism of action of the tumor reducing peptide from mistletoe extract (NSC 635089) cellular proliferation. *Cancer Letters* (66) 123-130. 1992
66. Mannsky P, J. Wallerstedt, D.B. Sannes, T.J. Staql, S. Johnson, L.L. Blackman, M.R. Grem, J.L. Swain, S.M. Monahan, B.P. NCCAM/NCI Phase 1 Study of Mistletoe Extract and Gemcitabine in Patients with Advanced Solid Tumours. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* (2013) 1-11 2013
67. Begley CG, Ellis LM. Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 2012 483: 531-533.
68. Estko M, Baumgartner S, Urech K, Kunz M, Requeiro U, Heusser P, Weissenstein U. Tumour cell derived effects on monocyte/macrophage polarization and function and modulatory potential of *Viscum album* lipophilic extract *in vitro*. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15: 130

CAPÍTULO 2

Efeitos do *Viscum album* em diluições homeopáticas decimais no desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos.

Effects of decimal homeopathic dilutions of *Viscum album* on Ehrlich tumor development in mice.

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

Resumo

Viscum album L. (VA) é uma planta semi-parasita que cresce em várias árvores hospedeiras, sendo popularmente denominada “Mistletoe”. Extratos obtidos desta planta têm conhecido efeito anti-neoplásico, conforme descrito em estudos clínicos em humanos e estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, os quais mostram indução da apoptose, citotoxicidade e atividade anti-angiogênica. No presente estudo, os efeitos do extrato etanólico de VA em diferentes diluições homeopáticas decimais (DH) foram avaliados em modelo murino de tumor de Ehrlich, considerando-se as relações entre o bem estar animal, a sobrevida, as mudanças na imunidade sistêmica e no micro-ambiente tumoral. Animais portadores de tumor ascítico tratados com VA em protocolo de diluições alternadas apresentaram aumento do peso em função do tempo ($p=0,0001$) e aumento do consumo de ração ($p=0,03$), sem mudança na sobrevida. O mesmo protocolo, quando aplicado a camundongos portadores de tumor sólido, induziu recuperação da população de linfócitos T (CD4+ e CD8+) esplênicos para níveis similares aos encontrados nos animais sem tumor ($p\leq 0,05$). Os camundongos portadores de tumor sólido e tratados com VA 3DH apresentaram redução significativa da massa tumoral observada histologicamente ($p=0,05$) e ausência de necrose. Todos os grupos tratados com VA desenvolveram maior edema peri-tumoral ($p\leq 0,05$). Não houve alterações na proporção de células positivas para Caspase 3, Ki67 e VEGF. Conclui-se que o tratamento com VA em diluições alternadas melhora da qualidade de vida do animal e a resposta imune sistêmica. Apenas diluições menores foram capazes de reduzir a massa tumoral. Propõe-se que o uso de extrato etanólico de VA em diferentes diluições decimais pode ser um recurso interessante como terapia oncológica complementar mesmo para tumores muito malignos, porém, ajustes nas combinações de doses e diluições são fundamentais para a obtenção dos efeitos desejáveis.

Palavras-chave: *Viscum album* L, oncologia experimental, Tumor de Ehrlich, imunologia dos tumores, diluições homeopáticas.

Abstract

Viscum album L. (VA) is a semi-plant parasite that grows on various host trees, being popularly called "Mistletoe". Extracts of this plant have known anti-neoplastic effects, as described in clinical studies performed in humans and experimental studies *in vitro* and *in vivo*, in which induction of apoptosis, cytotoxicity and anti-angiogenic activity are seen. In this study, the effects of the ethanolic extract of VA in different decimal homeopathic dilutions (DH) were evaluated in a murine model of Ehrlich tumor, considering the relationship among animal welfare, survival, changes in systemic immunity and tumor microenvironment. Animals bearing ascites tumor treated with VA on alternate dilutions protocol showed increase in weight versus time interaction ($p=0.0001$) and increase in food intake ($p=0.03$), with no change in survival. The same protocol as applied to mice bearing solid tumor induced the recovery of T lymphocytes (CD4+ and CD8+) population in spleen, which levels were similar to those found in tumor-free animals ($p=0.05$). Mice bearing solid tumor and treated with VA 3DH showed significant reduction in tumor mass observed histologically ($p=0.05$) and no necrosis. All groups treated with VA developed more intense peri-tumoral edema ($p=0.05$). There was no change in the proportion of cells positive for caspase 3, Ki67 and VEGF. It is concluded that the treatment with VA in alternate dilutions improves animal quality of life and systemic immune response. Only minor dilutions were able to reduce the tumor mass. It is proposed that the use of ethanolic extract of VA in different decimal dilutions can be an interesting feature as additional cancer therapy even for very malignant tumors, but adjustments in dose and dilution combinations are essential for obtaining the desired effects.

Keywords: *Viscum album* L, experimental oncology, Ehrlich ascites tumor, tumor immunology, homeopathic dilutions.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Marcadores utilizados na imuno-histoquímica.....	48
Quadro 2 – Escore de quantificação de tumor no coxim plantar. As imagens correspondem a cortes histológicos corados por HE capturadas em objetiva de 4x.	49
Quadro 3 – Marcadores de superfície e critérios utilizados para identificação dos sub-tipos celulares do baço pelo método de citometria de fluxo	51
Quadro 4 – Marcadores utilizados para análise de células do baço de camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida, por citometria de fluxo	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotomicrografia de corte histológico de coxim plantar inoculado com tumor de Ehrlich há 10 dias (grupo controle) mostrando derme dissociada (áreas claras) em função do edema estabelecido no local e focos de células tumorais em proliferação próximas a nervos. Objetiva 40x.....48
- Figura 2 – Fotomicrografia de tecido subcutâneo de coxim plantar inoculado com tumor de Ehrlich há 10 dias marcado por imuno-histoquímica para Ki67, VEGF e Caspase 3. Objetiva de 40x com ampliação digital.50
- Figura 3 – Gráficos de dispersão e histogramas obtidos do software Flow-Jo 7.6.6 para contagem de linfócitos B. demonstrando os “gates” e suas populações a partir de citometria de fluxo. As células analisadas foram obtidas de baço de camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com diferentes diluições de VA. A partir de um gate de leucócitos totais, obteve-se a contagem de células B1a, B1b e B2.52
- Figura 4 – Gráficos de dispersão e histogramas obtidos do software Flow-Jo 7.6.6 para contagem de linfócitos T. demonstrando os “gates” e suas populações a partir de citometria de fluxo. As células analisadas foram obtidas de baço de camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com diferentes diluições de VA. A partir de um gate de leucócitos totais, obteve-se a contagem de células CD19+ e CD19-. Dentre as células CD19-, obteve-se as populações de CD4+, CD8+ e CD25+.53
- Figura 5 – Curva de sobrevivência (dias) ao longo do período de desenvolvimento tumoral em camundongos inoculados com tumor de Ehrlich na forma ascítica e tratados diariamente, via sc, com protocolo de diluições alternadas de VA. LOG RANK TEST, sem significância.56
- Figura 6 – Evolução do ganho de peso ao longo do período de desenvolvimento tumoral em camundongos inoculados com tumor de Ehrlich na forma ascítica e tratados diariamente, via sc, com protocolo de diluições alternadas de VA (0,1 mL). ANOVA de duas vias aponta interação entre tratamento e tempo, *p=0,0005 (F=2,87).....56
- Figura 7 – Histograma e *dot plot* das populações de sub-tipos linfocitários esplênicos nos diferentes grupos, quantificadas por citometria de fluxo.....60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Frequência (%) de sinais clínicos ao longo do período de sobrevivência de camundongos inoculados com tumor de Ehrlich na forma ascítica e tratados diariamente, por via subcutânea, com protocolo de diluições alternadas de VA ou com veículo (controle). # $p=0,03$, Mann-Whitney test ($U=23,00$)55
- Tabela 2 – Avaliação do aumento da espessura do coxim plantar inoculado com tumor (em mm), avaliação dos escores de proporção da massa tumoral (mediana e intervalo) e da incidência de necrose, embolia, invasão tumoral local e presença de eosinófilos. Avaliação da positividade para diferentes marcadores tumorais identificados por imunohistoquímica. A positividade é expressa pela intensidade média de pixels de cor marrom somada à área marcada (em pixels). Todos os dados correspondem ao período de 10 dias após a inoculação do tumor. Os valores representam média \pm desvio padrão e porcentagem. # Teste exato de Fisher, sem significância estatística. (*)ANOVA, sem significância estatística. **Kruskal-Wallis ($KW=8,195$) / Dunn, $p\leq 0,05$ em relação ao controle.58
- Tabela 3 – Populações de sub-tipos linfocitários esplênicos nos diferentes grupos, quantificadas por citometria de fluxo. Os valores expressam o número de células $\times 10^2$ para cada 10000 eventos registrados pelo citômetro CANTO (BD). Valores representados por média \pm desvio padrão. * $p\leq 0,05$ em relação ao controle ($F \geq 3,952$), ANOVA / Tukey-Kramer.59

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	41
OBJETIVO	43
MATERIAL E MÉTODOS	44
ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
RESULTADOS.....	55
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

INTRODUÇÃO

O VA é um arbusto semi-parasita da família Lorantacea que possui uma ampla variedade de compostos biologicamente ativos que podem ser utilizados no tratamento do câncer, sendo as lectinas, as Viscotoxinas A3 e B e os triterpenos os mais investigados [1-5]. Na terapia do câncer, o VA é geralmente aplicado em doses baixas, uma vez que as lectinas exercem sua função imunomoduladora em concentrações menores [6]. Por exemplo, Mabed e colaboradores [7] trataram carcinoma hepatocelular avançado com 20 microgramas de extrato aquoso de VA, uma vez por semana. Como resultado, 13,1% dos pacientes obtiveram remissão completa do tumor observada por tomografia computadorizada e sobreviveram acompanhada até 38 meses; 8,7% dos pacientes apresentaram resposta parcial, 39,1% apresentaram doença progressiva e 39,1% não tiveram avaliação da resposta devido à morte precoce.

Diversos estudos com extratos da planta *Viscum album* (VA) mostram efeitos no controle da multiplicação de células tumorais em estudos experimentais [8-12] e clínicos, em humanos e animais[13-15]. Em revisões sistemáticas sobre o assunto, nota-se que o tratamento de certos tumores com VA é eficiente e seguro [16-18]. Tanto extrato de VA quanto a lectina isolada apresentam boa tolerabilidade, sendo que apenas edema discreto, eritema e dor local passageira são observados [19-21].

Estudos clássicos mostram que as viscotoxinas podem aumentar a quantidade de células natural-killer circulantes e, conseqüentemente, melhorar a resposta imune anti-tumoral[22]. Da mesma forma, a viscotoxina exerce efeito imunomodulador efetivo sobre granulócitos humanos e animais[23,24,25] e também tem ação na apoptose celular [26]. A ação citotóxica da viscotoxina é comparável à dos agentes quimioterápicos convencionais[27,28,29].

Preparações de VA também exercem efeito inibitório sobre a síntese de PGE2 por meio da inibição selectiva da COX-2[30]. Em pacientes humanos, Gardin, observou que a administração repetida de VA por via subcutânea (20 mg), duas vezes por semana, foi capaz de induzir aumento dos parâmetros da imunidade humoral e celular, incluindo as populações de células T, CD4+ e CD8+.[31] Paralelamente, sabe-se que o VA também induz apoptose de células endoteliais *in*

vitro [32], o que é corroborado pela observação de efeitos anti-angiogênicos *in vivo* [12]. Tais efeitos sobre vasos e leucócitos são indicadores importantes de que o VA também pode exercer seus efeitos anti-neoplásicos modificando o micro-ambiente tumoral e a interação entre tumor e células imunitárias[33-35] .

Medicamentos homeopáticos preparados a partir de extratos de vegetais com atividade anti-neoplásica têm sido estudados experimentalmente no Brasil e em outros países, sendo também objeto de revisões sistemáticas [36- 39] , contudo, não se encontra na literatura dados sobre os efeitos do VA preparado segundo a farmacotécnica homeopática clássica, mesmo que as formulações comerciais de VA disponíveis no mercado apresentem doses muito baixas de seus princípios ativos (CARVALHO e BONAMIN, *artigo submetido nesse volume*). Da mesma forma, os estudos experimentais publicados até então trazem informações pontuais sobre os mecanismos de ação deste medicamento nas células tumorais (indução de apoptose) ou nas células do sistema imune, mas não se observam artigos que mostrem a associação entre os aspectos imunológicos, histopatológicos e clínicos.

Este trabalho, portanto, visa contribuir com a literatura acerca dos efeitos do VA preparado homeopaticamente em animais portadores de tumor maligno agressivo, levando-se em conta as relações entre a resposta imune sistêmica, a evolução histológica do tumor, as manifestações clínicas biométricas e a sobrevida.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi descrever diferentes aspectos relacionados à fisiopatologia e clínica de animais portadores de tumor de Ehrlich nas formas ascítica e sólida frente ao tratamento exclusivo com o VA em diferentes potências homeopáticas; associadas ou únicas, considerando-se o crescimento tumoral, a organização histológica, a resposta imune sistêmica e a sobrevida.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 46 camundongos da linhagem Balb/c, machos (6 a 9 semanas de vida), mantidos em micro-isoladores (Techniplast®) no biotério de Experimentação animal – SPF do Centro de Pesquisa da UNIP (Campus Indianópolis), com água e ração *ad libitum*, controle de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade (55-65%), trocas de ar (75 ciclos/hora) e ciclos de luz (claro e escuro) 12/12horas.

Ética

Esta pesquisa foi aprovada e certificada pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Paulista em 19/06/2013 sob o protocolo n. 164/2013 – CEP/ICS/UNIP (anexo 1).

O desenho experimental foi planejado para atender aos requisitos de bem estar animal e ao conceito dos 3 Rs (*redução, substituição, reconstrução*). Assim, o estudo piloto possibilitou conhecer aspectos clínicos associados à sobrevida, utilizando o menor número de animais possível e evitando repetições experimentais nas etapas seguintes. Outros estudos realizados pelo nosso grupo foram executados em paralelo pelo mesmo período (aprovados pelo comitê de ética em protocolos específicos) com compartilhamento de ambos os grupos controle, a fim de atender às diretrizes brasileiras de ética em experimentação animal.

Preparo das células tumorais e inoculação

O tumor de Ehrlich foi obtido a partir de camundongos doadores, portadores de tumor na forma ascítica com 11 dias de evolução. O líquido ascítico foi colhido (2 a 3 ml) para a obtenção de uma suspensão celular, a qual foi centrifugada a 2500rpm por 5 minutos e resuspensa por três vezes em 2 ml de PBS, (solução salina tamponada) a fim de se obter uma coleção de células livres de debris e fibrina. A avaliação da viabilidade das células tumorais assim obtidas foi feita pelo método do azul de Tripam (0.1%, GIBCO), em que as células são diluídas na proporção 1:200, empregando-se uma câmara de Neubauer (HAUSSER SCIENTIFIC). A viabilidade

celular de pelo menos 90% foi estabelecida como critério para a utilização das células avaliadas.

A suspensão tumoral foi, então, inoculada nos animais experimentais em duas fases. Na primeira fase (estudo piloto), os camundongos foram inoculados com 10^6 células em um volume de 0,1ml por via intra-peritoneal; na segunda fase, os camundongos foram inoculados com 0,05ml da suspensão, contendo 10^5 células, no tecido sub-cutâneo plantar, para evolução do desenvolvimento do tumor na forma sólida. Neste caso, o prazo de 10 dias foi escolhido como “end-point” para que os resultados fossem analisados antes da piora clínica.

Preparação dos medicamentos

A tintura mãe do *Viscum album* (VA) foi obtida do Laboratório Schraiber® - Brasil e manufaturada pelo Laboratório Injectecenter® - Brasil. Os preparados homeopáticos injetáveis do VA foram dispensados em ampolas estéreis para produtos injetáveis de 1,1 ml em solução fisiológica 0,9%, nas potências 3DH, 9DH, 12DH, 30DH (Lote 5290, fabricado em 25/05/10 e com validade até 25/05/15). Os experimentos utilizando animais foram conduzidos entre Julho de 2013 e Janeiro de 2014. As diluições decimais foram feitas segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3ª edição.

Delineamento experimental

O projeto de pesquisa foi executado em duas partes. Na primeira parte – estudo piloto – os aspectos clínicos e de sobrevida foram analisados em camundongos portadores de tumor ascítico, tratados segundo um protocolo de diluições alternadas. Na segunda fase – avaliação imunológica e histológica – foram realizadas análises de parâmetros de celularidade do baço e de marcadores fenotípicos a partir de cortes histológicos do tumor, em animais tratados com o mesmo protocolo e com as diluições 3DH e 30DH separadamente.

Parte 1 – Estudo piloto - Avaliação semi-quantitativa de parâmetros clínicos, biométricos e sobrevida

Os animais previamente inoculados com tumor por via ip foram divididos em 2 grupos contendo 5 animais cada. Um grupo foi caracterizado como controle, sendo

tratado diariamente com 0,1 mL/10g de peso vivo de PBS por via sc na região cervical; o outro grupo foi caracterizado como grupo tratado, tendo recebido tratamento com VA, obedecendo um protocolo definido, cujos ciclos de 4 dias foram estabelecidos da seguinte forma: dia 1 – VA 3DH, dia 2 – VA 9DH, dia 3 – VA 12DH, dia 4 – VA 30DH, sendo 0,1 mL/10g peso vivo/dia. Os tratamentos tiveram início no dia seguinte à inoculação do tumor e perduraram por todo o período de sobrevivência.

Durante todo o ensaio também foi avaliada a condição clínica de cada animal, 5 dias por semana, conforme a incidência de sinais clínicos relevantes. Os itens avaliados foram: condição da pele, pêlos, dispnéia, secreções de mucosa ocular e genital, alterações comportamentais, como letargia, consumo de água e ração e temperatura superficial do corpo, medida com um termômetro digital Rycom Thermadoo.

Experimento 2 – Avaliação clínica e imunológica; expressão de marcadores fenotípicos no tumor sólido

Os camundongos inoculados com tumor na forma sólida foram divididos em 4 grupos de 6 animais cada e tratados (0,1 mL/10g peso vivo) por via subcutânea na região do dorso com: grupo 1 – veículo (solução salina); grupo 2 – VA seguindo o protocolo de diluições alternadas diárias, em 2 ciclos de 4 dias, conforme descrito na parte 1; grupo 3 – VA 30DH; grupo 4 – VA 3 DH. Um quinto grupo composto de animais não portadores de tumor que não receberam nenhum tratamento foi analisado em paralelo quanto aos aspectos imunológicos. Os tratamentos duraram 8 dias e os animais foram submetidos à eutanásia no 10º dia após a inoculação. Para a eutanásia, os animais foram sedados profundamente com 0,1mL de mistura Ketamina - Xilazina na proporção 2:1 para cada 10g de peso vivo (equivalente às doses de 20 mg/10g peso vivo de Xilazina e 10 mg/10g de peso vivo de Ketamina), até a interrupção dos sinais vitais. Em seguida foi realizado o deslocamento cervical para garantir a morte dos mesmos antes de realizar qualquer procedimento de necrópsia.

Imuno-histoquímica

Durante a necrópsia foram colhidos fragmentos da lesão tumoral, do linfonodo poplíteo da pata correspondente e do baço, sendo fixados em paraformaldeído 8% para posterior processamento histopatológico. Em seguida, foram encaminhados para a inclusão em parafina, microtomia (cortes de 5µm) e montagem dos cortes em lâminas silanizadas, para imuno-histoquímica, ou lâminas convencionais, para coloração por hematoxilina-eosina - HE.

Os cortes montados em lâminas silanizadas foram desparafinizados, re-hidratados e, em seguida, submetidos ao desmascaramento antigênico por tampão citrato (DAKO), em calor úmido (80°C), durante 20 minutos. Após o resfriamento, os cortes foram submetidos durante 5 minutos ao bloqueio da peroxidase endógena, em solução de H₂O₂ 5% diluída em metanol. Os cortes foram lavados por três vezes em PBS e os sítios de adsorção inespecíficos bloqueados com soro normal de eqüino 2,5% (*Vector®*), durante 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados em câmara úmida, *overnight*, a 4°C, com os anticorpos primários (**Quadro 1**). Em seguida, as lâminas foram incubadas durante 30 minutos com anticorpo secundário ligado a complexo polímero-peroxidase (*“Kit Impress Universal VECTOR”®*), em temperatura ambiente. As células positivas foram evidenciadas após a reação com DAB. Realizamos controles negativos de todas as reações utilizando o diluente dos anticorpos (DAKO) no lugar dos anticorpos primários.

Avaliação semi-quantitativa do tumor

As lâminas contendo cortes de coxim plantar foram observadas em microscópio NIKON E 200 e avaliadas por meio de escores (**Quadro 2**), quanto à proporção entre a área do tumor e a área do corte histológico. Para cada lâmina, todo o corte foi rastreado e avaliado utilizando objetiva de 4x.

Incidência de parâmetros tumorais histopatológicos

A incidência de eosinófilos, necrose, invasão tumoral e micro-embolia para cada grupo foi observada a partir de cortes corados em HE, em objetiva de 40 e 100x, utilizando microscópio NIKON E 200.

Quadro 1 – Marcadores utilizados na imuno-histoquímica

Marcador	Finalidade	Alvo Molecular	Espécie doadora	Clone	Diluição	Marca
VEGF	Angiogênese	Fator de crescimento	Rato	VG-1 monoclonal	1:200 com EDTA	Abcam®
Ki 67	Proliferação celular	Proteína nuclear e citoplasmática	Rato	Policlonal	1:1000	Abcam®
Caspase3	Apoptose	Proteína citoplasmática	Coelho	Policlonal	1:400	Abcam®

Histomorfometria

O edema do coxim plantar também foi quantificado a partir dos cortes corados em HE. A área de tecido dissociado (edema), que aparece como área clara nas fotomicrografias, foi calculada automaticamente, em pixels, pelo software Metamorph®, a partir de imagens capturadas em sistema NIKON E 200 – Coolpix ® com objetiva de 40x (**Figura 1**).

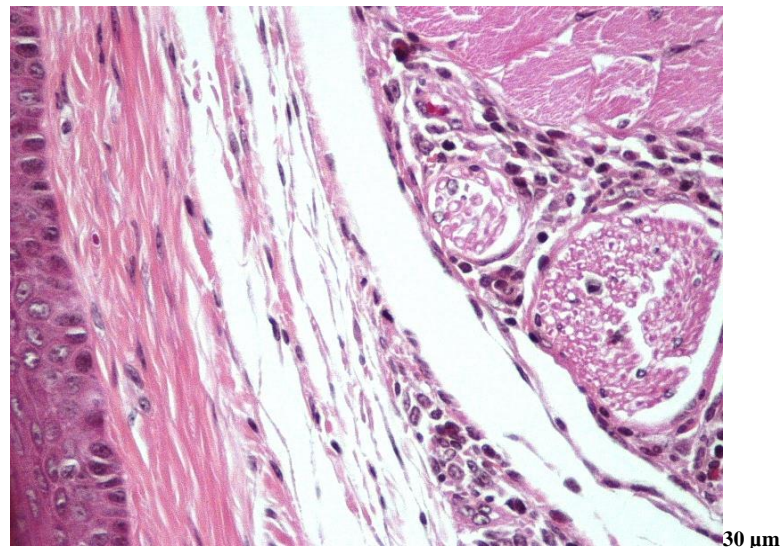
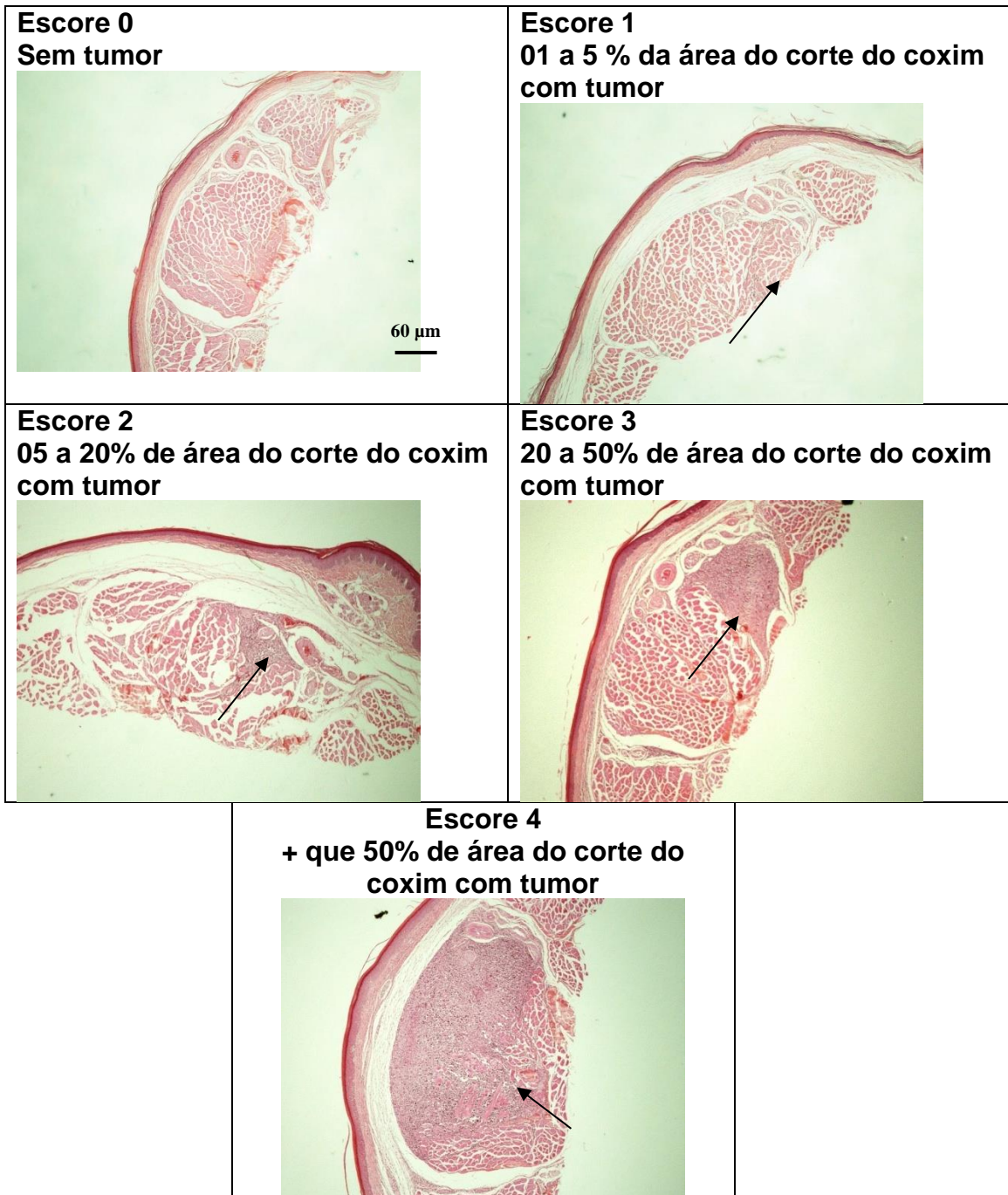


Figura 1 – Fotomicrografia de corte histológico de coxim plantar inoculado com tumor de Ehrlich há 10 dias (grupo controle) mostrando derme dissociada (áreas claras) em função do edema estabelecido no local e focos de células tumorais em proliferação próximas a nervos. Objativa 40x.

Quadro 2 – Escore de quantificação de tumor no coxim plantar. As imagens correspondem a cortes histológicos corados por HE capturadas em objetiva de 4x.



Entre 4 e 10 fotomicrografias da área correspondente ao tecido tumoral visualizado nos coxins marcados pela imuno-histoquímica foram feitas aleatoriamente, utilizando objetiva de 40x em microscópio Nikon Eclipse 200 acoplado a câmera digital Coolpix com monitor LCD. O número de campos fotografados variou conforme o tamanho da massa tumoral. A positividade para Caspase 3 e VEGF, marcados em castanho pelo DAB, foi calculada automaticamente, em pixels, usando o software Metamorph®. O software foi calibrado com filtros de cor digitais, com regulação de bits vermelho, verde e azul, de tal maneira que só foram incluídas células positivas, sendo a coloração de fundo excluída. Neste caso, levou-se em consideração a intensidade média da coloração marrom presente em cada campo analisado e a área média marcada. O índice de positividade foi calculado como a somatória de ambos os valores. O número de células positivas por campo para Ki 67 foi calculado pela contagem visual das mesmas, levando-se em conta apenas as células que apresentaram positividade nuclear (**Figura 2**).

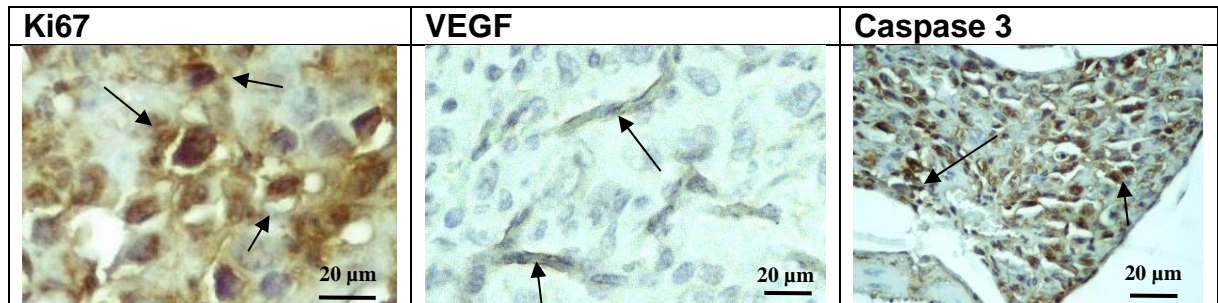


Figura 2 – Fotomicrografia de tecido subcutâneo de coxim plantar inoculado com tumor de Ehrlich há 10 dias marcado por imuno-histoquímica para Ki67, VEGF e Caspase 3. Objetiva de 40x com ampliação digital.

A escolha destes marcadores fundamenta-se nas características variáveis das células tumorais. A marcação e quantificação da Caspase 3, por sua vez, permitiram avaliar a incidência de células em processo de apoptose no tecido tumoral. A marcação de células endoteliais capilares positivas para VEGF e sua quantificação possibilitou avaliar possíveis interferências dos tratamentos estudados no processo de angiogênese local. A contagem de células positivas para Ki67 intranuclear foi útil para a avaliação da incidência de células tumorais em processo de proliferação.

Citometria de fluxo

Para a citometria de fluxo, um fragmento central do baço foi colocado numa placa de Petri plástica com uma gota de PBS-SFB 1%. As células foram ressuspensas com o auxílio do êmbolo de uma seringa e transferidas para um tubo Falcon, sendo mantidas em gelo até o processamento final. Para que a quantidade de células fosse suficiente para garantir uma leitura representativa ao citômetro, cada tubo continha um *pool* de suspensão celular obtidas de dois camundongos do mesmo grupo. Foi avaliada a quantificação de linfócitos T (CD4+, CD8+ e CD25+), linfócitos B1 e linfócitos B2, conforme descrito no **Quadro 3**.

Quadro 3 – Marcadores de superfície e critérios utilizados para identificação dos sub-tipos celulares do baço pelo método de citometria de fluxo

CÉLULAS	MARCADORES
Linfócitos B1	CD19+ CD23- CD11b+
Linfócitos B2	CD19+ CD23+ CD11b-
Linfócitos T	CD19- CD4+ ou CD19- CD8+
Linfócitos Treg ou T ativados	CD19- CD25+

Os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 2000rpm / 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Assim, 2mL de tampão hemolítico (GIBCO) foram usados para lavagem das células, sendo as mesmas incubadas por 2 minutos antes de serem submetidas a nova centrifugação. Após lavagem e ressuspensão em 1 mL de PBS, as células foram contadas em câmara de Neubauer (HAUSSER SCIENTIFIC) pelo método do azul de Tripam 0,1% (GIBCO), sendo utilizados os quadrantes laterais de leucócitos.

Em seguida, 10 microlitros de anticorpo anti-CD16/32 foram adicionados a 990 microlitros de PBS-BSA 1%, para preparo da solução bloqueadora, sendo que 10 microlitros da mesma foram colocados sobre a amostra, incubada a 4°C por 30 minutos. Após nova lavagem em PBS, o conteúdo de cada tubo foi passado para 3 microtubos em um volume calculado para conter 10^6 células por microtubo. Um microtubo foi designado como *sem marcar*, um microtubo como *combo 1* (linfócitos B) e o terceiro microtubo foi designado como *combo 2* (linfócitos T) (**Quadro 4**). Uma sequência adicional de amostras foi separada para a *marcação simples*, com cada um dos marcadores, para a compensação da positividade das amostras no

citômetro. Para cada 10^6 células foram adicionados 20 microlitros de anticorpo específico a 1%, seguido de incubação a 4°C por 40 minutos.

Quadro 4 – Marcadores utilizados para análise de células do baço de camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida, por citometria de fluxo

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, as células foram lavadas em PBS, centrifugadas, ressuspensas em 100 microlitros de PBS-BSA 1% com 400 microlitros de paraformaldeído 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 v10 para identificação dos “gates” (Figuras 3 e 4).

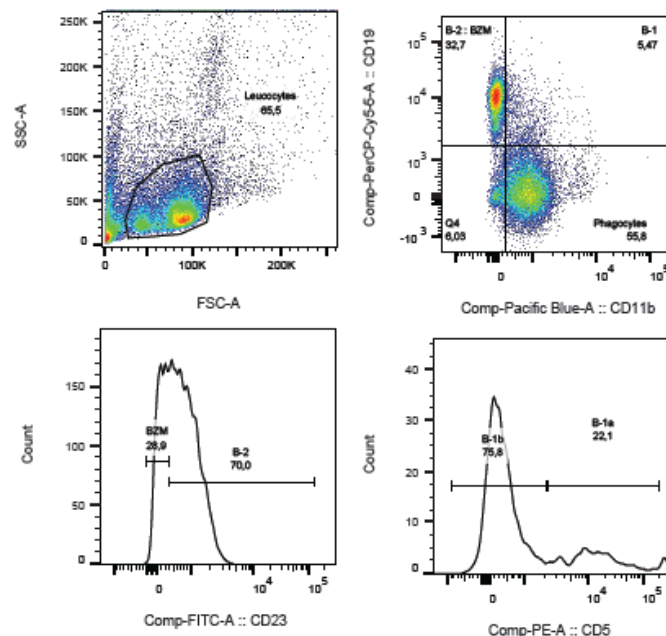


Figura 3 – Gráficos de dispersão e histogramas obtidos do software Flow-Jo 7.6.6 para contagem de linfócitos B. demonstrando os “gates” e suas populações a partir de citometria de fluxo. As células analisadas foram obtidas de baço de camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com diferentes diluições de VA. A partir de um gate de leucócitos totais, obteve-se a contagem de células B1a, B1b e B2.

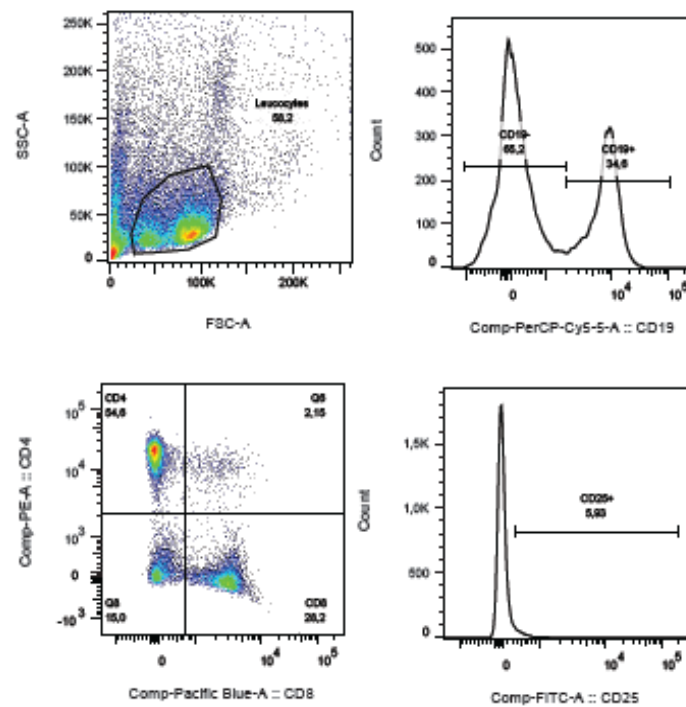


Figura 4 – Gráficos de dispersão e histogramas obtidos do software Flow-Jo 7.6.6 para contagem de linfócitos T. demonstrando os “gates” e suas populações a partir de citometria de fluxo. As células analisadas foram obtidas de baço de camundongos portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com diferentes diluições de VA. A partir de um gate de leucócitos totais, obteve-se a contagem de células CD19+ e CD19-. Dentre as células CD19-, obteve-se as populações de CD4+, CD8+ e CD25+.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A determinação da homocedasticidade das variáveis foi feita pelo teste de Bartlett (INSTAT 3.0). O teste ANOVA e Tuckey-Kramer foram utilizados para comparação de dados paramétricos entre 3 ou mais grupos. Kuskal-Wallis e Dunn foram usados para dados não paramétricos. Teste “t” de Student ou Mann-Whitney foram usados para comparação de dois grupos. Para análise dos dados obtidos da citometria de fluxo o teste do X^2 foi usado em adição, a fim de comparar as proporções entre as diferentes populações celulares do baço. Para os dados relativos à sobrevida foi utilizado o teste LOG RANK (BIOSTAT 5.0). Para o ganho de peso, foi utilizada a ANOVA de 2 vias (BIOSTAT 5.0). A comparação da ocorrência de sinais e alterações histológicas entre os grupos foi feita pelo teste exato de Fisher (INSTAT 3.0). Para todos os casos, os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Estudo piloto - Avaliação semi-quantitativa de parâmetros clínicos, biométricos e sobrevida

Não houve diferença entre os grupos em relação aos seguintes parâmetros: sobrevida, temperatura e frequência de sinais observáveis por inspeção, contudo, o consumo de alimento e o ganho de peso foi estatisticamente maior no grupo tratado com o protocolo de diluições alternadas de VA (**Tabela 1, Figuras 5 e 6**).

Tabela 1 – 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 subcutânea, com protocolo de diluições alternadas de VA ou com veículo (controle). # p=0,03, Mann-Whitney test (U=23,00)

Sinais clínicos	VA - protocolo	Controle
Tempo de sobrevida (número de dias para 100% de mortes)	23 dias	30 dias
Letargia / apatia	3/5 (60%)	3/5 (60%)
Cianose	4/5 (80%)	3/5 (60%)
Taquidispnéia	2/5 (40%)	1/5 (20%)
Diarréia	0/5 (zero)	1/5 (20%)
Piloereção	4/5 (80%)	3/5 (60%)
Temperatura media (°C)	31,16 ± 0,887	30,42 ± 0,858
Consumo médio de ração (g)	5,16 ± 0,416 #	4,70 ± 0,100
Consumo médio de água (mL)	5,88 ± 0,753	5,38 ± 0,383

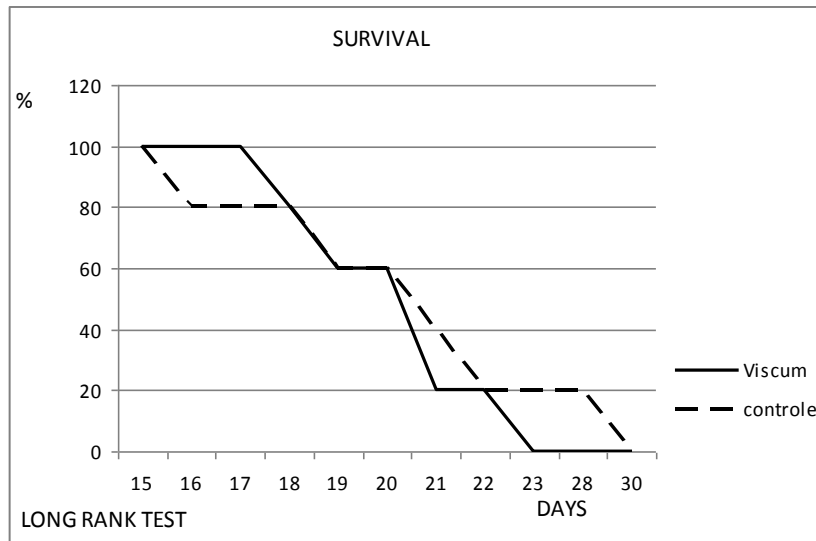


Figura 5 – Curva de sobrevivência (dias) ao longo do período de desenvolvimento tumoral em camundongos inoculados com tumor de Ehrlich na forma ascítica e tratados diariamente, via sc, com protocolo de diluições alternadas de VA. LOG RANK TEST, sem significância.*

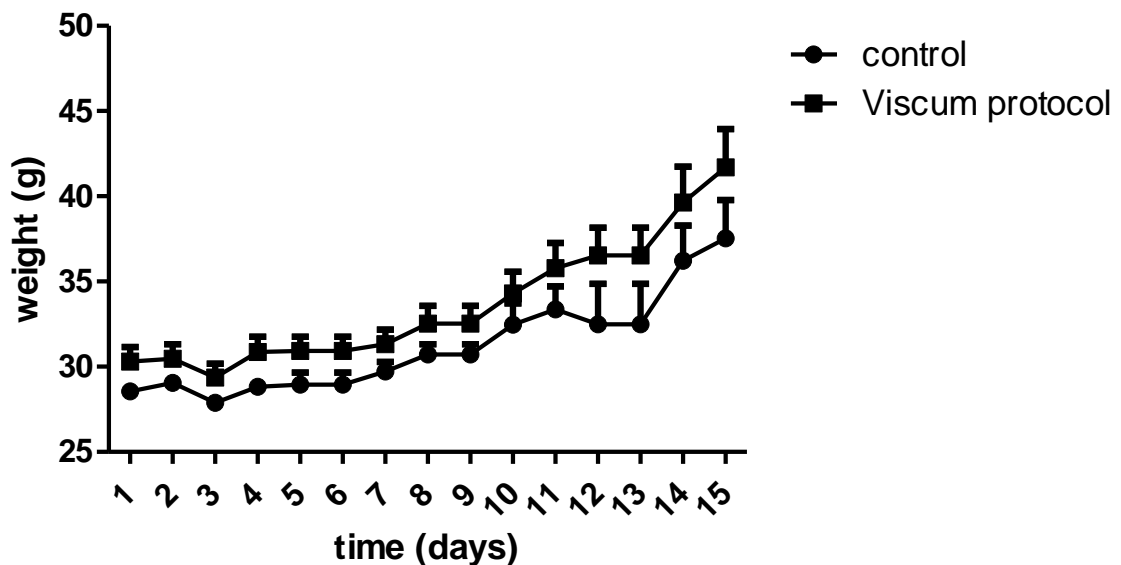


Figura 6 – Evolução do ganho de peso ao longo do período de desenvolvimento tumoral em camundongos inoculados com tumor de Ehrlich na forma ascítica e tratados diariamente, via sc, com protocolo de diluições alternadas de VA (0,1 mL). ANOVA de duas vias aponta interação entre tratamento e tempo, *p=0,0005 (F=2,87).

Experimento 2 – Avaliação clínica e imunológica; expressão de marcadores fenotípicos no tumor sólido

Avaliação macro e microscópica do tumor sólido

A análise semi-quantitativa dos cortes histológicos de coxim plantar inoculados com tumor de Ehrlich há 10 dias revelou que nenhum animal tratado com VA 3DH apresentou necrose (Fisher, sem significância), sendo que o escore de proporção de massa tumoral em relação à área total do corte teve redução significativa em relação aos demais grupos. Dentre os 6 animais deste grupo, apenas um teve escore 1 de crescimento tumoral, os demais apresentaram escore 0. (**Tabela 2**).

O grupo tratado com o protocolo de diluições alternadas de VA apresentou redução no número de células positivas para Ki67 em relação aos demais grupos, porém sem significância estatística (**Tabela 2**). O edema foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) em todos os grupos tratados com VA, o que pode justificar a ausência de alterações significativas na espessura do coxim plantar, mesmo com redução da massa tumoral, conforme observado histologicamente (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Avaliação do aumento da espessura do coxim plantar inoculado com tumor (em mm), avaliação dos escores de proporção da massa tumoral (mediana e intervalo) e da incidência de necrose, embolia, invasão tumoral local e presença de eosinófilos. Avaliação da positividade para diferentes marcadores tumorais identificados por imunohistoquímica. A positividade é expressa pela intensidade média de pixels de cor marrom somada à área marcada (em pixels). Todos os dados correspondem ao período de 10 dias após a inoculação do tumor. Os valores representam média \pm desvio padrão e porcentagem. # Teste exato de Fisher, sem significância estatística. (*)ANOVA, sem significância estatística. **Kruskal-Wallis (KW=8,195) / Dunn, $p \leq 0,05$ em relação ao controle.

	Controle	VA protocolo	VA 30DH	VA 3DH
Aumento da espessura do coxim plantar (em mm)	0,24 \pm 0,189	0,35 \pm 0,240	0,29 \pm 0,163	0,27 \pm 0,182
Incidência de tumor subcutâneo #	6/6	6/6	6/6	2/6
Escore proporção tumoral - mediana	2 (1-4)	1 (1-4)	2 (1-3)	0 (0-2) **
Necrose – incidência (HE) #	3/6 (50%)	2/6 (30%)	4/6 (75%)	0/6 (0%)
Embolia – incidência (HE) #	5/6 (80%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	5/6 (50%)
Invasão tumoral incidência (HE) #	6/6 (100%)	6/6 (100%)	4/6 (80%)	4/4 (80%)
Eosinófilos incidência (HE) #	2/6 (30%)	1/6 (15%)	2/6 (30%)	2/6 (30%)
Edema Pixels x 10⁴	24,54 \pm 12,326	34,85 \pm 6,833**	38,431 \pm 4,361**	36,57 \pm 5,266**
CASPASE 3 (*) Pixels	108,83 \pm 48,113	133,16 \pm 16,611	138,78 \pm 18,560	134,37 \pm 13,46
VEGF (*) Pixels x 10³	13,871 \pm 3,033	7,912 \pm 7,842	5,970 \pm 3,293	4,046 \pm 3,198
Ki67 (*) células positivas/campo	0,6 \pm 0,736	0,1 \pm 0,333	0,88 \pm 0,850	0,50 \pm 0,674

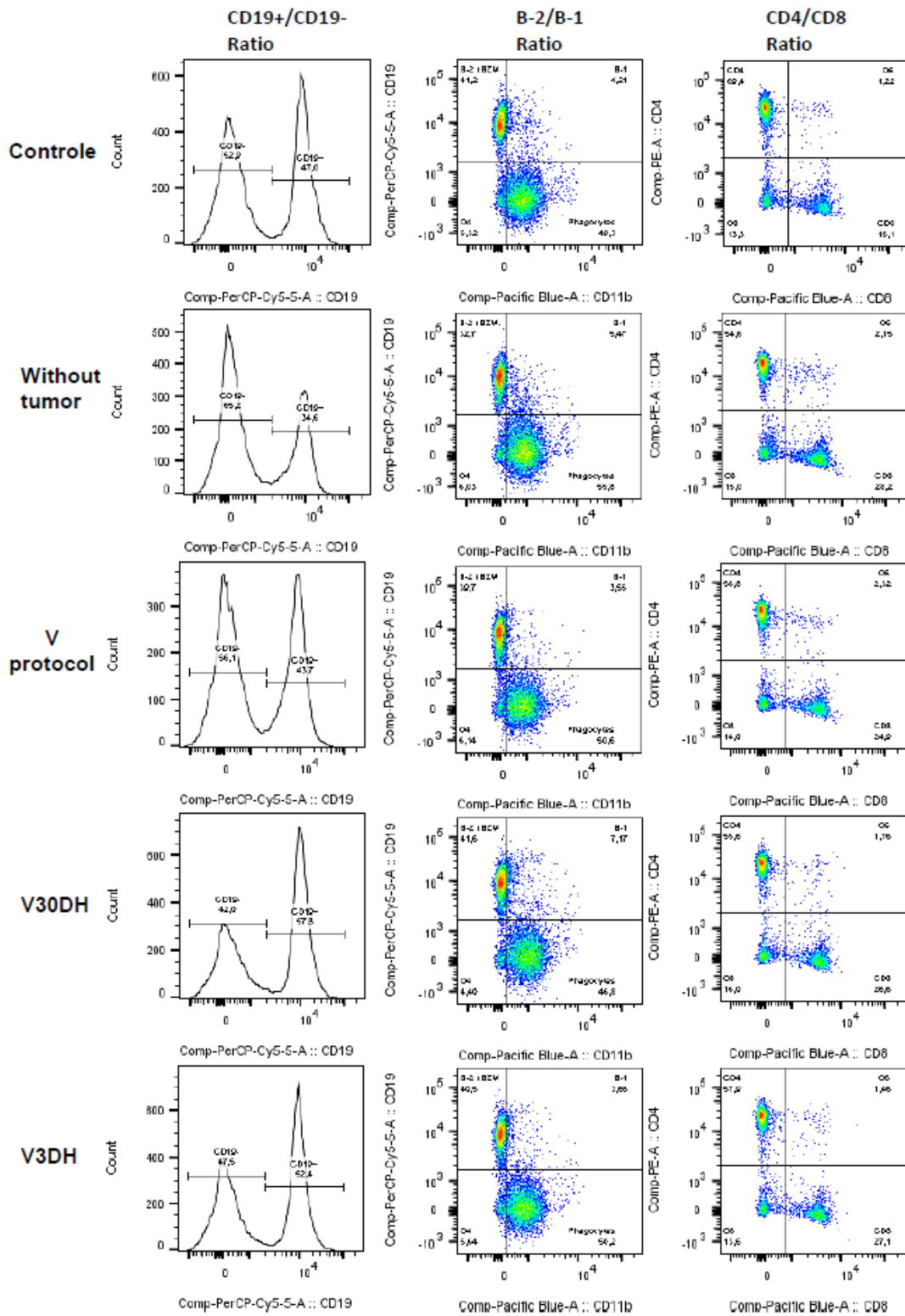
Avaliação das sub-populações leucocitárias no baço por citometria de fluxo

A contagem de células positivas na citometria de fluxo foi calculada para 10000 eventos, conforme padrão estabelecido para o citômetro de fluxo CANTO (BD). A **Tabela 3** expressa esta contagem e releva que a presença do tumor sólido no coxim plantar gera redução estatisticamente significativa na população de linfócitos T esplênicos, incluindo os sub-tipos CD4+ e CD8+ especificamente, bem como redução na população de linfócitos B, o que denota a ação imunossupressora do tumor de forma sistêmica. Contudo, os animais tratados com VA segundo o protocolo de diluições alternadas apresentaram recuperação destes valores de forma comparável ao observado no grupo controle (**Tabela 3, Figura 7**), resgatando a imunocompetência dos animais portadores de tumor. Não houve mudanças nos valores de células B1 e T CD25+.

Tabela 3 – Populações de sub-tipos linfocitários esplênicos nos diferentes grupos, quantificadas por citometria de fluxo. Os valores expressam o número de células x 10² para cada 10000 eventos registrados pelo citômetro CANTO (BD). Valores representados por média ± desvio padrão. *p≤0,05 em relação ao controle (F ≥ 3,952), AVOVA / Tuckey-Krammer.

	Controle	Sem tumor	VA protocolo	VA 30DH	VA 3DH
Linfócitos T totais (CD19-)	36,16 ± 3,611	60,35 ± 10,536 *	53,46 ± 10,962 *	51,26 ± 8,764	47,90 ± 5,910
CD4+	38,00 ± 6,814	58,80 ± 1,838 *	61,56 ± 1,709 *	51,40 ± 17,952	41,73 ± 15,046
CD8+	22,50 ± 1,952	27,10 ± 2,545 *	25,90 ± 0,755 *	24,80 ± 3,819	22,56 ± 4,725
CD25+	9,97 ± 1,420	5,92 ± 1,922	8,55 ± 1,752	9,06 ± 0,820	10,20 ± 0,845
Linfócitos B2 (CD19+ CD23+)	61,33 ± 10,435	76,90 ± 2,262 *	57,43 ± 9,600	57,96 ± 3,811	55,40 ± 7,076
Linfócitos B1 (CD19+ CD11b+)	24,81 ± 5,237	2,74 ± 0,714	2,33 ± 1,065	3,50 ± 0,523	3,32 ± 1,126

Figura 7 – Histograma e *dot plot* das populações de sub-tipos linfocitários esplênicos nos diferentes grupos, quantificadas por citometria de fluxo.



DISCUSSÃO

Um dos principais problemas da quimioterapia do câncer é a pressão seletiva sobre clones celulares mais malignos e mais resistentes à morte celular, o que gera recidivas constantes e deterioração da qualidade de vida do paciente até o êxito letal. Além disto os efeitos tóxicos das drogas utilizadas, não se refere no modelo de micro – doses ao usar o VA [40]. A possibilidade de uso do VA como terapia complementar e até substitutiva de alguns tipos de câncer têm sido estudada em ensaios clínicos em humanos e animais, com resultados interessantes. [7,15,16,41,42,43,44,45,46,] dada à presença de princípios ativos citotóxicos, como as viscotoxinas e triterpenos[9,45] e princípios ativos imuno-ativos, como as lectinas [1,47]. Contudo, parte das limitações de seu uso como terapia de eleição para alguns tumores refere-se à falta de literatura sobre a atividade dos extratos de VA sobre a integração entre as células tumorais e a resposta imune local e sistêmica [35]. Por outro lado, observa-se que certos princípios ativos são particularmente eficazes quando em concentrações muito baixas, como é o caso das lectinas [1]. A necessidade de controlar todos os efeitos que a enfermidade cancerígena provoca nos indivíduos doentes, tem sido estudado de forma experimental como droga modal, ou seja, a medicação tem que estabelecer respostas múltiplas, como entre outras ativação do sistema imune do hospedeiro, indução da apoptose de células tumorais, intervenção no circuito imunomodulador em p53 [34,48].

O presente estudo, portanto, visou avaliar os efeitos de diferentes diluições decimais de VA preparadas segundo a farmacopéia homeopática brasileira, no desenvolvimento de um tumor maligno experimental, o carcinoma ascítico de Ehrlich [49], levando-se em conta o crescimento tumoral nas formas ascítica e sólida, bem como seu impacto na sobrevida, na capacidade de infiltração tecidual, na resposta imune sistêmica e em alguns aspectos particulares do micro-ambiente tumoral, como a angiogênese[12,50,51].

Os resultados obtidos mostram que o uso do protocolo de diluições alternadas gera respostas locais e sistêmicas interessantes e que, associadas, podem impactar tanto na regressão do tumor quanto no equilíbrio imunológico e clínico do animal doente. O tratamento dos animais portadores de tumor ascítico não impediu a progressão do tumor nem modificou o tempo de sobrevida, contudo, aumentou o

consumo de ração ao longo do período de observação, o que denota aumento nos indicadores de qualidade de vida. O ganho de peso nestes animais também foi maior em relação ao controle, mas parte desse ganho pode estar associado à exsudação peritoneal e aumento de volume ascítico. Os dados obtidos com o tumor sólido reforçam essa hipótese, pois mostram aumento de edema no sítio de inoculação do tumor em todos os animais tratados com VA.

A redução de quase 100% da massa tumoral e da necrose observável histologicamente foi constatada no grupo tratado com VA 3DH, a preparação mais concentrada de princípios ativos. A análise das características fenotípicas do tumor nos animais tratados com o protocolo de diluições alternadas mostrou redução no número de células positivas para Ki67 por campo microscópico, sem contudo apresentar significância estatística. Os valores de positividade para Caspase 3 e VEGF não apresentaram diferenças entre os grupos. Estes dados, tomados em conjunto, sugerem que o mecanismo provavelmente envolvido na regressão tumoral pelo tratamento com VA esteja associado mais à inibição da proliferação tumoral do que à apoptose e à redução da angiogênese[51]. Comparando-se esses achados com a literatura recente, observa-se que, embora a indução da apoptose seja o principal mecanismo citotóxico do VA *in vitro* [8,27], há situações experimentais em que a inibição da proliferação celular prevalece, pelo bloqueio do ciclo celular [35,52]. Neste caso, a observação de possíveis variações no controle da apoptose e angiogênese tumoral talvez fosse perceptível ao longo do processo de regressão, mas esses parâmetros podem ter sido mascarados pela própria remissão do tumor ao cabo de 10 dias.

A constatação de maior distensão do tecido subcutâneo periférico ao tumor, entendido como edema inflamatório, ainda carece de explicações quanto aos mecanismos envolvidos. Sabe-se que o VA tem atividade moduladora da resposta inflamatória no sítio tumoral [53] , por alterar a atividade secretora de células dendríticas, mas pouco se sabe sobre seus efeitos sobre mediadores vaso-ativos. [50] constataram *in vitro* a atividade citotóxica do VA sobre células endoteliais, o que pode ser um mecanismo plausível para justificar o aumento do edema local. Por outro lado, [54] demonstraram a atividade anti-oxidativa do extrato etanólico de VA em camundongos portadores de tumor de Ehrlich, implicando em redução da resposta ascítica, o que não foi observado neste estudo, como também por

Sárpataki [46]. Tais discrepâncias reforçam o conceito de que a forma de preparação do extrato de VA interfere diretamente nos efeitos *in vivo*, em função do balanço de seus princípios ativos.

Talvez a principal contribuição prática desses achados esteja na possibilidade de se otimizar um protocolo terapêutico com diferentes concentrações de extrato de VA que combine a ação anti-tumoral das viscotoxinas e triterpenos com a melhora dos parâmetros clínicos e fisiopatológicos - sobretudo imunológicos - induzidos pela ação da leptinas, de forma que se possa ter uma evolução clínica constante e progressiva do paciente até a remissão completa do tumor e com pouquíssimos efeitos indesejáveis.

Recentemente, várias críticas têm sido feitas sobre a abordagem excessivamente linear dos estudos pré-clínicos envolvendo drogas anti-neoplásicas[55] , em que muitas repetições de um mesmo experimento são feitas para balizar apenas um ou outro parâmetro específico da atividade anti-tumoral, sem levar em conta o contexto biológico, o que implica em uso excessivo de animais de laboratório e pouca correlação com a realidade clínica[56]. O modelo experimental proposto, portanto, permite uma abordagem integrada de aspectos sistêmicos e locais, em relação à evolução tumoral, contribuindo para uma nova abordagem nesta área do conhecimento. Há de destacar que poucos estudos experimentais envolvem a observação da sobrevida [45], sendo este conhecimento de suma importância para o embasamento do uso de VA na prática médica, mesmo que observando rigorosamente o princípio dos 3Rs.

Os dados obtidos sugerem que o uso de extratos de VA em diferentes concentrações combinadas pode ser uma ferramenta útil no tratamento de tumores muito malignos.

CONCLUSÃO

A avaliação de diferentes protocolos de tratamento do tumor de Ehrlich em camundongos com extrato de VA diluído segundo a Farmacopéia Homeopática Brasileira põe em evidência os seguintes efeitos: a) o tratamento com protocolo de diluições alternadas de VA promove melhora na qualidade de vida dos animais portadores de tumor de Ehrlich na forma ascítica, observada pelo maior consumo de alimento, sem modificar a sobrevida; antagoniza os efeitos imunossupressores do tumor sólido, promovendo recuperação das sub-populações linfocitárias no baço para níveis comparáveis aos animais livres de tumor, especialmente das células T CD4+ e T CD8+; reduz o crescimento tumoral no tecido subcutâneo; b) o tratamento com VA 3DH reduz em quase 100% o crescimento tumoral no tecido subcutâneo, sem induzir necrose local e sem modificar parâmetros imunológicos; c) todos os protocolos testados aumentam a intensidade de edema no sítio primário do tumor, sugerindo ação pró-inflamatória local.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Delebinski C, Twardziok T, Kleinsimon S, Hoff F, Mulsow K, Rolf J, Jäger S, Eggert A, Seiffert G. A Natura Combination Extract of *Viscum album L.* Containing Both Triterpene Acids and Lectins Is Highly Effective against AML *In Vivo* PloS ONE 2015 10(8)
- 2 Yuying M, Ronghua F, Mengmeng D, Zhiguo Y, Yunli Z. Pharmacognosy Magazine 2015 (43) 455-462.
- 3 Baumgartner S, Flückiger H, Kunz M, Scherr C, Urech K. Evaluation of Preclinical Assays to Investigate an Anthroposophic Pharmaceutical Process Applied to Mistletoe (*Viscum album L*) Extracts. Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine 2014 (8) Article ID 620974
- 4 Rainer Scheer. 4th Mistletoe Symposium. Mistletoe in Tumour Therapy. Basic Research and Medicinal Use. Phytomedicine 2007; (14) 1-2.
- 5 Kauczor G, Delebinski C, Jäger S, Seeger K, Seifert G. P01.18. Triterpene acid containing *Viscum album L.* extracts mediate apoptosis in paediatric solid cancer cells. BMC Complement Altern Med. 2012; 12(Suppl 1): P18
- 6 Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard. *Viscum album* agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. British Journal of Haematology. 2005 Aug; 130(4) 527-535
- 7 M Maged L, Ei-Helwl, S Shammaa. Phase II study of viscum fraxini-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Br J Cancer 2004, 90: 65-69.
- 8 Facina A, Facina G, Silva I D C G, Gonçalves A G, Almeida A F. *Viscum Album* Modulates Apoptotic Related Genes in Melanoma Tumor of Mice. American Journal of Molecular Biology 2014 (4) 49-58
- 9 Strüh C M, Jager S, Schemp C M, Scheffler A, Martin S F. A Novel Triterpene Extract from Mistletoe Induces Rapid Apoptosis in Murine B16.F10 Melanoma Cells. Phytotherapy Research 2012 (26) 1507-1512.
- 10 Kilingbeil M F G. Ação do *Viscum album* em cultivo celular de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (tese) São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2010. 161f.
- 11 Lopes D F, Silveira L, Sibata M, Carvalho A C, Soares C, Saade J, Pacheco M. Use of dispersive Raman spectroscopy to detect the cytotoxic action of viscum album in adenocarcinoma of colon Journal of Laser Applications 2009, 21 (4) 163-168.
- 12 Park W B, Lyu S Y, Kim J H, Choi S H, Chung H K, Ahn S H, Hong S Y, Yon T J, Chom M J. Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by Korean Mistletoe Lectin is Associated with Apoptosis and Antiangiogenesis. Archives of Pharmacology Research 2000 (16) 439-447

- 13 Werner, M. Efficacy and Safety of Mistletoe Extract in the Palliative Therapy of Patients Suffering from Pancreatic Cancer (PALM-Pan) Study no. 33-04, EudraCT no. 2014-002386-30 Kirschweg 2014/9.
- 14 Tröger W, Galun D, Reif M, Schumann A, Stankovic N, Milicévic M. *Viscum album* {L.} extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: A randomised clinical trial on overall survival. *European Journal of Cancer* 2013 (49) 3788–3797
- 15 Clottu-Christeien O C, Klocke P, Burger D, Strub R, GERBER, V; Treatment of Clinically Diagnosed Equine Sarcoid with a Mistletoe Extract (*Viscum album austriacus*). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010 (34) 1483-1489.
- 16 Büssing A, Raak C, Ostermann T. Quality of life and related dimensions in cancer patients treated with mistletoe extract (iscador) : a meta-analysis. *Evidence Based Complement Alternative Medicine* 2012: (2) 219402
- 17 Kienle G S, Kiene H. Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: A systematic review of controlled clinical studies. *Integrative Cancer Therapie* 2010 (2) 142-157.
- 18 Ghelman R. . Ação do *Viscum album* sobre a prenhez da rata albina (*Rattus norvegicus albinus*, RODENTIA, MAMMALIA): estudo morfológico e radiológico. *Genetics and Molecular Biology*. 2005 (28) 278-278.
- 19 Stein G M, Berger P A, Characterisation of immunological reactivity of patients with adverse effects during therapy with an aqueous mistletoe extract *European Journal of Medical Research* 1999;4(5):169-77
- 20 Steele M L, Axtner J, Happe A, Kröz M, Matthes H, Schad F. Adverse Drug Reactions and Expected Effects to Therapy with Subcutaneous Mistletoe Extracts (*Viscum album* L.) in Cancer Patients. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014.11p
- 21 Gunver S, Kienle I, Renate G, Kiene H, Helmut K. Institute for Applied Epistemology and Medical Methodology at the University of Witten/Herdecke, Zechenweg 6, 79111 Freiburg, Germany *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2011 11-72 .
- 22 Tabiasco J F, Pont J J, Fournié, Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 2002 269:2591.
- 23 Sárpataki O, Sevastre B, Stan L R K, Olah N K, Hanganu D, Bedecian I, Ionescu C, Marcus I. *Viscum album* influence on the antioxidant enzymes activity in Ehrlich tumor cells in vivo *Anticancer Research*: 2013 28(3B) 1893-7 2013
- 24 Jäger S, Winkler K, Pfüller U, Scheffler A. Solubility Studies of Oleanolic Acid and Betulinic Acid in Aqueous Solutions and Plant Extracts of *Viscum album* L. *Planta Medica* 2007,73(2):157-162

- 25 Giudici M, Pascual R, Canal L de la, Pfüller K, Pfüller U, Villadin J. Interaction of Viscotoxins A₃ and B with Membrane Model Systems: Implications to Their Mechanism of Action. *Biophys J*. 2003 Aug; 85(2): 971–981.
- 26 Kauczor G, Delebinski C, Jäger S, Seeger K G Seifert G. Triterpene acid containing *Viscum album* L. extracts mediate apoptosis in paediatric solid cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012 12(Suppl 1):P18.
- 27 Weissenstein U, Kunz M, Urech K, Baumgartner S. Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects *in vitro* *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, 14:6
- 28 Van Wely M, Stoss M, Gorter RW: Toxicity of a standardized mistletoe extract in immunocompromised and healthy individuals. *Am J Ther* 1999, 6:37-43.
- 29 Kuttan G, Vasudevan D M, Kuttan R. Effect of a preparation from *Viscum album* on tumor development in vitro and in mice. *J Ethnopharmacol*. 1990 Apr;29(1):35-41. Amala Cancer Research Centre, Trichur, Kerala, India.
- 30 Hegde ,Maddur M S,Friboulet A, Bayry J, Kaveri S, V. *Viscum album* Exerts Anti-Inflammatory Effect by Selectively Inhibiting Cytokine- Induced Expression of Cyclooxygenase-2. *PloS One* 2011 6 (10): e26312.
- 31 Gardin N. Immunological response to mistletoe (*Viscum album* L.) in cancer patients: a four-case series. *Phytotherapy Research* 23,407-411 2009
- 32 Sriramulu-Elluru, Jean-Paul H, Sandrine D M, Kazatchkine, Friboulet A, Srinivasa K , Jagsdees . Induction of maturation and activation of human dendritic cells: A mechanism underlying the beneficial effect of *Viscum album* as complementary therapy in cancer. Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie – Paris 2008
- 33 Hanahan, D. Weinberg, R, A; Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011 V.(144) 4 March P 646 – 647.
- 34 Podlech O, Harter P, N Mittelbronn M, Pöschel S, Naumann U. Fermented Mistletoe Extract as a Multimodal Antitumoral Agent in Gliomas. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012.
- 35 Estko M, Baumgartner S, Urech K, Kunz M, Reguero U, Heusser P, Weissenstein U, Tumour cell derived effects on monocyte/macrophage polarization and function and modulatory potential of *Viscum album* lipophilic extract in vitro. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15: 130.
- 36 Bonamin LV, Cardoso TN, Carvalho AC, Amaral JG. A systematic review about animal models in homeopathic research: the last five years of PubMed indexed papers. Proceedings of the XXIX GIRI Meeting; 2015 June 3 – 5; Verona (Italy). *Int J High Dilution Res*. 2015; 14(2): 45-45 45

- 37 Arora S, Tandon S. DNA fragmentation and cell arrest: a hallmark of apoptosis induced by *Ruta graveolens* in human colon cancer cells. *Homeopathy* 2015 Jan;104(1):36-47
- 38 Khuda-Bukhsh A R, Sikdar S. Condurango 30C Induces Epigenetic Modification of Lung Cancer-specific Tumour Suppressor Genes via Demethylation *Forsch Komplementmed.* 2015 v. 22, n. 3, p.172-9.
- 39 P.C. Endler, K. Thieves, S. Baumgartner, L. Bonamin. Fundamental research models on high dilution homeopathy-A project on the state of repetition. *European Journal of Integrative Medicine* 2009 1 181-221
- 40 Bonamin, L.V (Ed) *Signal and Images: contributions and contradictions about high dilution research.* Dordrecht .Springer, 2008.222pp.
- 41 Lefebvre GNF, Bonamin LV, Oliveira CM. Treatment of transmissible venereal tumor (tvt) in dogs with *Viscum album*. *Clínica Veterinária* 2007 n. 70, p. 78-86,.
- 42 Mannsky P, J. Wallerstedt, D.B. Sannes, T.J. Staql, S. Johnson, L.L. Blackman, M.R. Grem, J.L. Swain, S.M. Monahan, B.P. NCCAM/NCI Phase 1 Study of Mistletoe Extract and Gemcitabine in Patients with Advanced Solid Tumours. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2013. 1-11 2013
- 43 Kienle GS, Kiene H. Influence of *Viscum Album L* (European Mistletoe) Extracts on Quality of Life in Cancer Patients: A Systematic Review of Controlled Clinical Studies. *Integr Cancer Ther.* 2010;9:142–157.
- 44 Carvalho A C, Porto E, Bonamin. Canine neurofibrosarcoma treatment with *Viscum album* in serial dilutions. *Proceedings of the XXVII GIRI Symposium; 2013 Sep 03-04; Bern (Switzerland).*
- 45 Delebinski CI, Jaeger S, Kemnitz-Hassanin K, Henze G, Lode HN, Seifert GJ. A new development of triterpene acid containing extracts from *Viscum album L.* displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Prolif* Apr 2012 45(2):176-87
- 46 Sárpataki O, Sevastre B, Olah N K, Hnganu D, Taulescu M, Manalachioae R, Cato C, Marcus I. Antitumor effects of *Viscum album L.* on Ehrlich Ascites Carcinoma *In vivo.* *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine* 2011 68(1).321-327
- 47 Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D, *In vitro* effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis) *Arzneim Forsch / Drug Res* 1993 43:1221-1227.
- 48 Saha S, Hossain D M S, Mukherjee S, Mohanty S, Mazumdar M, Mukherjee S, Ghosh U K, Nayek C, Ravendar C, Khurana A, Chakrabarty R, Sa G, Das T. *Calcarea carbonica* induces apoptosis in cancer cells in p53-dependent manner via an immuno-modulatory circuit. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013, 13:230

- 49 Silva A, Santos F, Cassali G. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2006 Vol.58 (4)
- 50 Duong V H J P, Bayry J, Delignat S, Gaston A T, Michel O, Bruneval P, Kazatchkine M D, Nicoletti A, Kaveri S V. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Molecular Medicine* 2002. 8(10):600-6.
- 51 Elluru S R, Duong V H J P, Deligant S, Prost F, Heudes D, Kazatchkine M D, Friboulet A, Kaveri S V. Antiangiogenic properties of *Viscum album* extracts are associated with endothelial cytotoxicity. *Anticancer Res* 2009 29(8):2945-50.
- 52 Kovacs .Investigation of the proliferation,apoptosis/necrosis,and cell cycle phases in several human multiple myeloma cells line. Comparasion of *Viscum album* QuFr extracts with vincristine in an in vitro model.The Scientific World Journal 2010 (10) 311-320.
- 53 Elluru S R, Duong V H JP, Deligant S, KAazatchkine M D, Friboulet A, Kaveri S V, Bayry J. Induction of maturation and activation of human dendritic cells: a mechanism underlying the beneficial effect of *Viscum album* as complimentary therapy in cancer. *BMC Cancer*.,2008 8:161.
- 54 Stan R L, Hangan A C, Dican L, Sevastre B, Hanganu D, Catoi, C, Sarpataki O, Ionescu C M. Comparative study concerning mistletoe viscotoxins antitumor activity. *Acta Biol Hung.* 2013 64(3):279-88. doi: 10.1556/ABiol.64.2013.3.2.
- 55 Begley C G, & Ellis L M. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 2012 (483) 551-553
- 56 McGrath J C, Curtis M J. BJP is changing it requirements for scientific papers to increase transparency. *British Journal of Pharmacology* 2015 (172) 2671-2674