

UNIVERSIDADE PAULISTA

LARISSA BÉJA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE PREPARAÇÕES
HOMEOPÁTICAS DE *Phytolacca decandra* SOBRE CÉLULAS
DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

SÃO PAULO

2020

LARISSA BÉJA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE PREPARAÇÕES
HOMEOPÁTICAS DE *Phytolacca decandra* SOBRE CÉLULAS
DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

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

Orientadora Prof. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado

SÃO PAULO

2020

Béja, Larissa.

Avaliação *in vitro* do efeito de preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* sobre células de adenocarcinoma mamário humano / Larissa Béja. - 2020.

38 f. : il.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Biologia da diferenciação e transformação celular: Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos.

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

1. Câncer de mama.
 2. *Phytolacca decandra*.
 3. Doxorrubicina.
 4. Ultra diluições.
 5. Homeopatia.
 6. MCF-7.
- I. Pérez Hurtado, Elizabeth Cristina (orientadora). II. Título.

LARISSA BÉJA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE PREPARAÇÕES
HOMEOPÁTICAS DE *Phytolacca decandra* SOBRE CÉLULAS
DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

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

Aprovado em: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____

Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin

Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____

Profa. Dra. Silvia Regina Kleeb

Universidade Metodista – UMESP

_____/_____/_____

Profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado

Universidade Paulista – UNIP

Dedico este trabalho a minha família, aos amigos e a
minha incrível orientadora!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de cursar o programa de Pós- graduação, pela saúde e pelas pessoas maravilhosas que entraram na minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista (UNIP) pela oportunidade da concretização deste trabalho.

As Profas. Dra. Elizabeth Perez Hurtado e Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin, pela orientação prestada com muita dedicação e paciência, desde a idealização deste trabalho até a sua finalização.

A Profa. Dra. Ivone Mackowiak, por abrir as portas do seu laboratório e dividir seu imenso conhecimento.

Aos meus amigos e alunos da UNIP e a minha família que acompanharam e auxiliaram em toda a trajetória.

RESUMO

O câncer de mama é o tumor maligno mais frequentemente diagnosticado na população feminina e representa um problema crítico de saúde pública por ser a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo. Para o tratamento do câncer além da terapêutica alopática convencional, a homeopatia pode ser combinada ao tratamento, para minimizar suas reações adversas e proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes. Estudos recentes do grupo mostraram tanto em ensaios *in vivo* como *in vitro* que preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* em baixas diluições possuem potenciais efeitos antitumorais contra células de adenocarcinoma mamário murino 4T1, entretanto os mecanismos de ação envolvidos não foram completamente esclarecidos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos das preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* sobre as células de adenocarcinoma mamário humano linhagem MCF-7. Para isto, células de adenocarcinoma mamário foram cultivadas na presença ou ausência de *Phytolacca decandra* tintura-mãe ou nas diluições centesimais Hahnemannianas (CH) de *Phytolacca decandra*: 30CH e 200CH. Determinação das porcentagens de apoptose/necrose, produção de citocinas, ensaio de migração celular por *wound healing* e possíveis alterações morfológicas foram avaliadas após 24, 48 e 72 horas de cultura em cada um dos tratamentos. Resultados obtidos nas análises de morte celular evidenciaram que o tratamento com diluições homeopáticas apresenta comportamento semelhante ao apresentado pelas células tratadas com Doxorrubicina: aumento da viabilidade nas primeiras 24 horas e queda acentuada da viabilidade em 48 e 72 horas. Em contraste, diferentemente das células tratadas com Doxorrubicina ou *Phytolacca decandra* tintura-mãe, a produção das citocinas pró e anti-inflamatórias não apresentou diferenças marcantes após tratamento das células com diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* quando comparadas às células não tratadas nos três tempos avaliados. De forma semelhante, análises da morfologia celular não apresentaram diferenças expressivas antes e após tratamento com as diluições homeopáticas, já a tintura-mãe apresentou alterações celulares marcantes com observação de possíveis corpos apoptóticos nos três tempos avaliados. Em conjunto estas análises mostram que diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* levam a aumento da citotoxicidade das células de adenocarcinoma mamário humano sem presença marcante de processo inflamatório. Os resultados obtidos das análises de morte celular por citometria, liberação de citocinas e migração celular são apresentados, no presente

trabalho em formato de artigo o qual será submetido após da defesa ao periódico: *Internacional Journal of Oncology*.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignant tumor in the female population and represents a critical public health problem because it is the leading cause of cancer death among women worldwide. For the treatment of cancer in addition to conventional allopathic therapy, homeopathy can be combined with treatment to minimize their adverse reactions and provide better quality of life to patients. Recent studies of the group have shown both in vivo and in vitro assays that homeopathic preparations of *Phytolacca decandra* in low dilutions have potential antitumor effects against murine breast adenocarcinoma cells - 4T1, however the mechanisms of action involved have not been fully clarified. Thus, the objective of this work was to evaluate in vitro the effects of homeopathic preparations of *Phytolacca decandra* on human breast adenocarcinoma cells MCF-7 strain. For this, breast adenocarcinoma cells were cultured in the presence or absence of *Phytolacca decandra* tincture mother or in the Hahnemannian centesimal dilutions (CH) of *Phytolacca decandra*: 30 CH and 200 CH. Determination of percentages of apoptosis/necrosis, cytokine production, wound healing cell migration assay and possible morphological changes were evaluated after 24, 48 and 72 hours of culture in each of the treatments. Results obtained in cytotoxicity analyses showed a higher percentage of death in cells treated with homeopathic dilutions, with behavior similar to that presented by cells treated with Doxorubicin. In contrast, unlike cells treated with Doxorubicin or *Phytolacca decandra* tincture mother, the production of pro and anti-inflammatory cytokines showed no marked differences after treatment of cells with homeopathic dilutions of *Phytolacca decandra* when compared to untreated cells in the three evaluated times. Similarly, cell morphology analyses did not present significant differences before and after treatment with homeopathic dilutions, while the mother dye presented marked cellular alterations with observation of possible apoptotic bodies in the three times evaluated. Together these analyses show that homeopathic dilutions of *Phytolacca decandra* lead to increased cytotoxicity of human breast adenocarcinoma cells without the marked presence of an inflammatory process. The results obtained from the analysis of cell death by cytometry, cytokine release and cell migration are presented in the present study in article format, which will be submitted after the defense to the journal: *Internacional Journal of Oncology*.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	0
2. REFERÊNCIAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	4
3. ARTIGO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	7
INTRODUÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	19
MATERIAL E MÉTODOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	0
Medicamentos	Erro! Indicador não definido.	0
Cultura celular	Erro! Indicador não definido.	
Avaliação de apoptose e necrose por análises de citometria de fluxo .	Erro! Indicador não definido.	
Coloração de Giemsa	Erro! Indicador não definido.	2
Avaliação da migração e proliferação celular pelo ensaio wound healing	Erro! Indicador não definido.	2
Avaliação de citocinas pela técnica de CBA.....	Erro! Indicador não definido.	3
Análise estatística.....	Erro! Indicador não definido.	3
RESULTADOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	5
Potências homeopáticas de Phytolacca decandra exibem comportamentos semelhantes à Doxorrubicina em relação a viabilidade das células MCF-7	Erro! Indicador não definido.	5
Tratamento com diluições homeopáticas de Phytolacca decandra não induzem alterações morfológicas relevantes nas células MCF-7.....	27	
Tratamento com diluições homeopáticas de Phytolacca decandra não induzem alterações no padrão de migração das células MCF-7	Erro! Indicador não definido.	
Células MCF-7 após tratamento com as potências homeopáticas de Phytolacca decandra não apresentam marcante aumento de citocinas inflamatórias.....	Erro! Indicador não definido.	1
DISCUSSÃO		33
REFERÊNCIAS		38
ANEXO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	1

1. REVISÃO DE LITERATURA

O câncer de mama é o tumor maligno mais frequentemente diagnosticado na população feminina. Ele representa um problema crítico de saúde pública por ser a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo (COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015; GONZALEZ-ANGULO; MORALES-VASQUEZ; HORTOBAGYI, 2007; SIEGEL et al., 2012). Atualmente o câncer de mama é considerado uma doença heterogênea, que pode ser classificada em subtipos de acordo com os fatores de risco, apresentação clínica, características histopatológicas e resposta a terapias sistêmicas (SPITALE et al., 2009).

A estratificação do câncer da mama por subtipos é relevante e necessária para o prognóstico, predição e seleção do tratamento, realizado com base em marcadores imuno-histoquímicos e, clínico-patológicos como: tamanho do tumor, grau tumoral, envolvimento nodal, tipo histológico e margens cirúrgicas (DAI et al., 2016; SPITALE et al., 2009). Entretanto, apesar dos avanços no tratamento da doença, aproximadamente 30% dos pacientes diagnosticadas em fase inicial apresentarão doença recorrente (GONZALEZ-ANGULO, et al., 2007).

Estas recorrências são explicadas pela existência de características moleculares que tornam as células tumorais mais resistentes aos tratamentos convencionais. A resistência à morte celular e promoção do processo inflamatório são algumas das características que sustentam o crescimento e progressão das células tumorais. Por isto, recentes pesquisas suportam a hipótese do papel central do apoptose na tumorigenese (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

Apoptose é a morte celular programada onde há a degradação de todos os componentes intracelulares; as alterações do citoesqueleto induzem contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina e formação de vesículas chamadas corpos apoptóticos (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Na apoptose inicial não há rompimento da membrana celular, portanto a integridade da membrana permite, de modo geral, que não ocorra o estabelecimento de reação inflamatória, uma das características da morte por necrose (ELMORE, 2007). Células malignas são caracterizadas pela redução da capacidade de sofrer apoptose na resposta a vários estímulos. A inativação do caminho pró-apoptótico ou ativação do caminho anti-apoptótico resulta na falha apoptótica, promovendo a sobrevivência das células transformadas (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Contudo, defeitos nos mecanismos de morte celular desempenham papéis importantes na patogênese tumoral permitindo que células neoplásicas sobrevivam além de sua expectativa de vida, mesmo em condições de hipóxia e estresse oxidativo (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Assim, a expansão da massa tumoral associa-se com alterações genéticas acumuladas que levam a desregulação da proliferação e diferenciação celulares que promovem angiogênese, aumento na motilidade celular e invasividade, sinais característicos da progressão tumoral que precede a formação de metástases (JAN; CHAUDHRY, 2019; REED, 2003). A presença de tumores secundários ou metástases tanto no câncer de mama como em todos os tipos de cânceres é, na maioria dos casos o evento terminal para os pacientes. Por isto, diversas estratégias de tratamento são voltadas principalmente para o controle e prevenção da doença metastática (BURSCH, 2000; DAI et al., 2016; HAJRA; LIU, 2004; REED, 2003).

Atualmente, encontram-se disponíveis para o tratamento do câncer de mama as modalidades cirúrgicas e radioterápicas, utilização de agentes citotóxicos, hormonais e imunoterapêuticos (GONZALEZ-ANGULO; MORALES-VASQUEZ; HORTOBAGYI, 2007; SIEGEL et al., 2012). Entretanto, devido agressividade da maioria destes tratamentos, a qualidade de vida dos pacientes é afetada. Neste contexto, o uso de terapias complementares, como a homeopatia é de grande importância e interesse na área da oncologia.

A homeopatia é um sistema de medicina complementar praticada por mais de 200 anos (SUNILA et al., 2009). Foi criada em 1796, pelo médico alemão Samuel Hahnemann, fundamentada na Lei dos Semelhantes. O remédio homeopático é indicado pela semelhança constitucional do paciente e os sintomas da doença em relação a patogenesia do medicamento, descrito nas matérias medicas homeopáticas (BELLAVITE et al., 2015; BONAMIN; ENDLER, 2010).

A literatura atual demonstra maior sobrevida em pacientes com câncer que associam a homeopatia com a alopata convencional durante o tratamento (GAERTNER et al., 2014). A melhoria na qualidade de vida em pacientes oncológicos, tratados com medicamentos homeopáticos seja como terapia antitumoral e/ou como suporte aos efeitos colaterais dos quimioterápicos convencionais, justifica a realização de estudos mais aprofundados para investigar seu real potencial terapêutico (ARORA et al., 2013; FRENKEL, 2009; SAHA et al., 2013; SUNILA et al., 2009). Assim, nos últimos anos, tem sido registrado aumento no número de estudos pré-clínicos tanto *in vitro* como *in vivo* realizados com o intuito de avaliar a atividade terapêutica ou a eficácia de alguns

medicamentos homeopáticos (BELLAVITE et al., 2006). Entretanto, ainda não estão completamente esclarecidos os mecanismos de ação da maioria desses medicamentos.

A *Phytolacca decandra* é uma planta comum, perene encontrada na América do Norte e Central. Crescem em solos ricos e úmidos em clareiras as margens de floresta e estradas. Ao longo da história teve seu uso na medicina popular para o tratamento de afecções mamárias, problemas gastrointestinais, inflamações e erupções cutâneas (GHOSH et al., 2013). A identificação dos compostos com atividade biológica demonstrou efeito antibacteriano, anti-inflamatório, antioxidante, antivirais e antitumoral, a caracterização fitoquímica revelou presença de terpenóides, saponinas, alcaloides, resinas, ácido fitolácico e tanino como os principais ingredientes bioativos da espécie (DAS et al., 2014; JUNG et al., 2015; PATRA et al., 2014; RAVIKIRAN; RAJU; VENUGOPAL, 2011)

Os efeitos antitumorais desta planta estão atribuídos ao ácido ascórbico, aslolona, betacaroteno, cariofilina, isoqueracetina, ácido oleanólico, riboflavina, tanino e tiamina (DAS et al., 2014; JUNG et al., 2015; PATRA et al., 2014; RAVIKIRAN; RAJU; VENUGOPAL, 2011). O uso da tintura-mãe homeopática, conforme a farmacopeia brasileira (extrato etanólico da raiz da planta) é indicado para reumatismo crônico, conjuntivite, doenças de peles e afecções glandulares (DAS et al., 2014). (RAVIKIRAN; RAJU; VENUGOPAL, 2011) descrevem as principais indicações homeopáticas da *Phytolacca decandra* para pacientes que apresentem mastite, mama endurecida e muito sensível, tumores mamários com glândulas axilares aumentadas, abscessos mamários, rachaduras e pequenas úlceras sobre os mamilos, entre outras.

Considerando os relatos acima sob a *Phytolacca decandra*, estudos recentes do grupo em modelos *in vitro* e *in vivo* de adenocarcinoma mamário murino demonstraram que diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* exibiam efeitos antitumorais sobre essas células (NOGUEIRA, 2016; SANTOS, WILLIAN ALVES DOS, 2018). Entretanto os mecanismos de ação de *Phytolacca decandra* sobre células de adenocarcinoma mamário humano não foram ainda complementarmente esclarecidos.

Assim, levando em consideração o potencial efeito antitumoral da *Phytolacca decandra*, o intuito do atual estudo foi avaliar os efeitos das diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra*, nas potências 30CH e 200CH sobre células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) em relação à viabilidade e produção de citocinas pro ou anti-inflamatórias. Os resultados obtidos nesta pesquisa estão apresentados a continuação no

capítulo 3, em formato de artigo para posterior submissão no periódico *International Journal of Oncology*.

Estes achados são relevantes e com certeza contribuirão na compreensão dos efeitos e possíveis mecanismos de ação de ultra diluições de *Phytolacca decandra* sobre células de adenocarcinoma mamário ou outros tipos tumorais altamente metastáticos.

2. REFERÊNCIAS

- ARORA, S. et al. Anti-proliferative effects of homeopathic medicines on human kidney, colon and breast cancer cells. **Homeopathy**, v. 102, n. 4, p. 274–282, out. 2013.
- BELLAVITE, P. et al. Immunology and Homeopathy. 2. Cells of the Immune System and Inflammation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 1, p. 13–24, 2006.
- BELLAVITE, P. et al. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. **Homeopathy**, v. 104, n. 2, p. 139–160, abr. 2015.
- BONAMIN, L. V.; ENDLER, P. C. Animal models for studying homeopathy and high dilutions: Conceptual critical review. **Homeopathy**, v. 99, n. 1, p. 37–50, jan. 2010.
- BURSCH, W. Cytoskeleton and programmed cell death. p. 10, 2000.
- COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **ANTICANCER RESEARCH**, p. 8, 2015.
- DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281–1294, 2016.
- DAS, J. et al. Strong Anticancer Potential of Nano-triterpenoid from Phytolacca decandra against A549 Adenocarcinoma via a Ca²⁺-dependent Mitochondrial Apoptotic Pathway. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 7, n. 3, p. 140–150, jun. 2014.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.
- FRENKEL. Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 36, n. 2, 27 dez. 2009.
- GAERTNER, K. et al. Additive homeopathy in cancer patients: Retrospective survival data from a homeopathic outpatient unit at the Medical University of Vienna. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 22, n. 2, p. 320–332, abr. 2014.

GHOSH, S. et al. Homeopathic mother tincture of *Phytolacca decandra* induces apoptosis in skin melanoma cells by activating caspase-mediated signaling via reactive oxygen species elevation. **Journal of Integrative Medicine**, v. 11, n. 2, p. 116–124, mar. 2013.

GONZALEZ-ANGULO, A. M.; MORALES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYI, G. N. Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patients with Breast Cancer. In: YU, D.; HUNG, M.-C. (Eds.). **Breast Cancer Chemosensitivity**. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2007. v. 608p. 1–22.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 691–704, nov. 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

JAN, R.; CHAUDHRY, G.-S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205–218, jun. 2019.

JUNG, C. et al. Antitumor Activity of Americanin A Isolated from the Seeds of *Phytolacca americana* by Regulating the ATM/ATR Signaling Pathway and the Skp2–p27 Axis in Human Colon Cancer Cells. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 12, p. 2983–2993, 24 dez. 2015.

NOGUEIRA, L. ESTUDO DOS EFEITOS DE PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DE *Phytolacca decandra* NA EVOLUÇÃO DE ADENOCARCINOMA MAMARIO EM MODELO MURINO. p. 63, 2016.

PATRA, J. K. et al. Antibacterial effect of crude extract and metabolites of *Phytolacca americana* on pathogens responsible for periodontal inflammatory diseases and dental caries. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 343, dez. 2014.

RAVIKIRAN, G.; RAJU, A.; VENUGOPAL, Y. *Phytolacca americana*: A Review. v. 2, p. 5, 2011.

REED, J. C. Apoptosis-targeted therapies for cancer. **Cancer Cell**, v. 3, n. 1, p. 17–22, jan. 2003.

SAHA, S. et al. Calcarea carbonica induces apoptosis in cancer cells in p53-dependent manner via an immuno-modulatory circuit. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 230, dez. 2013.

SANTOS, WILLIAN ALVES DOS, S. Efeitos de altas diluições de Phytolacca decandra na viabilidade e expressão do fator HER-2 em Adenocarcinoma mamário murino (4T1) in vitro. **SÃO PAULO**, p. 47, 2018.

SIEGEL, R. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, n. 4, p. 220–241, jul. 2012.

SPITALE, A. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 4, p. 628–635, abr. 2009.

SUNILA, E. S. et al. Dynamized Preparations in Cell Culture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–263, 2009.

3. ARTIGO

“*Phytolacca decandra* NAS POTÊNCIAS 30CH E 200CH EXIBEM COMPORTAMENTOS SEMELHANTES À DOXORRUBICINA NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO, SEM A LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Larissa Beja¹, Thiago Albuquerque Viração¹, Jaqueline de Carvalho Arjona¹, Sandra Kalil¹, Leoni Villano Bonamin¹ e Elizabeth Cristina Perez¹

¹Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista-UNIP, São Paulo, SP - Brasil;

RESUMO

O câncer de mama é o tumor maligno diagnosticado em maior frequência na população feminina. Para minimizar os efeitos colaterais das terapias convencionais contra o câncer, medicamentos homeopáticos têm sido associados a estes protocolos terapêuticos para proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para avaliar os efeitos e mecanismos de ação dos medicamentos homeopáticos. Levando em considerando os efeitos desencadeados pela Doxorrubicina (Doxo), quimioterápico de uso convencional no tratamento de carcinoma mamário, o intuito do presente trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos das preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* sobre as células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7). Para isto, células MCF-7 foram tratadas ou não com 3 µg/mL de Doxorrubicina, *Phytolacca decandra* tintura-mãe ou nas diluições 30CH e 200CH. Aumento na viabilidade (Anexina⁻/7ADD⁺) das células MCF-7 foi evidenciada nas primeiras 24 horas após o tratamento tanto com Doxorrubicina como com as ultra diluições de *Phytolacca decandra*: 30CH e 200CH (77,8%, 87,8% e 85,6%, respectivamente). Nos tempos de 48 e 72 horas esta viabilidade cai abruptamente, sendo mais marcante no tratamento com Doxo (1,5% e 2,8%, 52,7% e 30,2 e; 63,8% e 26,8%, respectivamente). Em contraste, o tratamento com a tintura-mãe (TM) apresentou, nos

três tempos, percentuais de viabilidade semelhantes aqueles das células sem tratamento (35,1%; 18,6% e 37,1%, respectivamente). Em paralelo, análises da morfologia celular evidenciam arquitetura celular preservada nas células tratadas com 30CH e 200CH, com características semelhantes as células não tratadas, porem com presença marcante de vacúolos no tempo de 72 horas, especialmente com o tratamento 200CH. Já nos tratamentos com Doxo e TM, sofrimento celular é evidente com presença de núcleos picnóticos (Doxo) e estruturas semelhantes com corpos apoptóticos (TM). Interessantemente, análises de citocinas pró e anti-inflamatórias, mostram redução significativa na liberação de citocinas pró-inflamatórias nos tratamentos com 30CH e 200CH quando comparadas à Doxorrubicina nos três tempos. Em conjunto, estas análises mostram que diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* exibem efeitos semelhantes à Doxorrubicina em relação à viabilidade das células de adenocarcinoma mamário, porém sem promover liberação de citocinas inflamatórias, possíveis responsáveis das manifestações adversas dos medicamentos convencionais.

Palavras-chave: Câncer de mama; *Phytolacca decandra*; Doxorrubicina; ultra diluições, homeopatia; MCF-7

INTRODUÇÃO

No ano de 2018 ao redor do mundo 9.6 milhões de pessoas morreram por câncer, segundo o Observatório Global de Câncer da Organização Mundial de Saúde (BRAY et al., 2018). O câncer de mama é o tumor maligno mais frequentemente diagnosticado na população feminina, que representa um problema crítico de saúde pública por ser a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo (COMSA; CÎMPEAN; RAICA, 2015; GONZALEZ-ANGULO; MORALES-VASQUEZ; HORTOBAGYI, 2007; SIEGEL et al., 2012). O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea, que pode ser classificada em subtipos de acordo com os fatores de risco, apresentação clínica, características histopatológicas e resposta a terapias sistêmicas (SPITALE et al., 2009). Encontram-se disponíveis para o tratamento do câncer de mama as modalidades cirúrgicas e radioterápicas, utilização de agentes citotóxicos, hormonais e imunoterapêuticos (GONZALEZ-ANGULO; MORALES-VASQUEZ; HORTOBAGYI, 2007; SIEGEL et al., 2012). Entretanto, devido à agressividade da maioria destes tratamentos, a qualidade de vida dos pacientes é afetada. Neste contexto, o uso da homeopatia como um método complementar é atualmente de interesse na área da oncologia, por minimizar os efeitos colaterais dos medicamentos convencionais trazendo mais conforto aos pacientes com câncer (SUNDQVIST, 2020).

A homeopatia é um sistema de medicina complementar fundamentada na Lei dos Semelhantes, criada em 1796 pelo médico alemão Samuel Hahnemann, (SUNILA et al., 2009). O remédio homeopático é indicado pela semelhança constitucional do paciente e dos sintomas da doença em relação à patogenesia do medicamento, descrito nas matérias medicas homeopáticas (BELLAVITE et al., 2015; BONAMIN; ENDLER, 2010).

A *Phytolacca decandra* é uma planta comum, perene encontrada na América do Norte e Central. Crescem em solos ricos e úmidos em clareiras as margens de floresta e estradas. Ao longo da história teve seu uso na medicina popular para o tratamento de afecções mamárias, problemas gastrointestinais, inflamações e erupções cutâneas (GHOSH et al., 2013).

Ravikiran e colaboradores (2011) descrevem as principais indicações homeopáticas da *Phytolacca decandra* para pacientes que apresentem mastite, mama endurecida e muito sensível, abcessos mamários e tumores mamários com glândulas axilares aumentadas. Assim, baseado na experiência de três gerações utilizando tratamentos homeopáticos, o protocolo de *Banerji* indica como primeira linha de

tratamento para o câncer de mama, a *Phytolacca decandra* na potência 200CH (BANERJI; BANERJI, 2016; BANERJI; CAMPBELL; BANERJI, 2008).

Contudo, considerando os relatos acima sob a *Phytolacca decandra*, estudos recentes do grupo demonstraram que em modelos *in vitro* e *in vivo* de adenocarcinoma mamário murino, diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* exibiam efeitos antitumorais sobre essas células (NOGUEIRA, 2016; SANTOS, WILLIAN ALVES DOS, 2018). Entretanto os mecanismos de ação de *Phytolacca decandra* sobre células de adenocarcinoma mamário humano não foram ainda completamente esclarecidos. Desta forma considerando o potencial efeito antitumoral da *Phytolacca decandra*, o atual estudo pretende avaliar os efeitos de diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* sobre células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) para contribuir na compreensão dos mecanismos de ação de este medicamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Medicamentos

Medicamentos homeopáticos de *Phytolacca decandra* nas diluições 29CH (escala Centesimal Hahnemanniana), 199CH, tintura-mãe e veículo hidroalcóolico 30%, preparados segundo a farmacopeia brasileira, foram fornecidos pela farmácia homeopática Sensitiva (São Paulo – SP) credenciada pela ANVISA, (ANEXO1).

As potências 30CH e 200CH foram preparadas usando a escala centesimal Hahnemanniana (CH), a partir das diluições 29CH e 199CH, respectivamente. Para isto, ambas as potências foram diluídas respectivamente, 100 vezes em água ultra pura estéril. Em seguida, as mesmas foram submetidas ao processo de succussão automática em braço mecânico Denise® (AUTIC, BRASIL), de acordo com o procedimento estabelecido na Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3^a Edição (ANVISA, 2011). Todos os procedimentos de preparo e estocagem dos medicamentos foram realizados em condições de esterilidade usando fluxo laminar.

Cultura celular

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Kátia Cândido Carvalho do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular - LIM 58, da Disciplina de Ginecologia do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Estas células

foram cultivadas em meio completo (R10), preparado com RPMI- 1640 (Gibco- Thermo Fisher Scientific, Massachussetts, USA) acrescido de 10% de soro bovino fetal inativado (SFB) (Gibco - Thermo Fisher, Massachussetts, USA) e solução antibiótica de estreptomicina e penicilina (100 unidades/ mL de cada antibiótico, Gibco-Thermo Fisher Scientific, Massachussetts, USA). As células foram mantidas em incubadora (Thermo Fisher) a 37°C com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. Para coleta ou posteriores repiques, as células foram expostas por aproximadamente 1 min a tripsina para descolamento total das células.

Para os ensaios, células com viabilidade maior de 90% foram cultivadas nas concentrações de 5×10^5 células viáveis para placas de 24 poços e 1×10^4 células viáveis para placas de 12 poços. Após aproximadamente 12 horas de incubação, sobrenadante foi removido e meio R10 novo, filtrado (0,22 micrômetros, Millipore®), contendo ou não 10% de *Phytolacca decandra* tintura-mãe; álcool (véculo homeopático); *Phytolacca decandra* 30CH; *Phytolacca decandra* 200CH ou 3 µg/mL de Doxorrubicina (Rubidox, Laboratório Químico Farmacêutico Bérgamo, Brasil) foi adicionado em cada um dos respectivos poços. Para cada tratamento, células foram plaqueadas em quadruplicatas mantendo as mesmas condições de cultura e tratamento por 24, 48 e 72 horas. O delineamento experimental foi realizado de forma que todas as análises, em quadruplicata fossem provenientes de uma mesma população celular e igualmente tratada. Tal desenho experimental possibilitou reduzir eventuais vieses associados à instabilidade genética das células, cujas características fenotípicas podem mudar entre diferentes passagens de replicação. Dessa forma, os resultados obtidos foram complementares e facilmente comparáveis entre si.

Avaliação de apoptose e necrose por análises de citometria de fluxo

Para a avaliação da viabilidade celular após os respectivos tratamentos foi utilizado *PE annexin V Apoptosis Detection Kit I* conforme as instruções do fabricante BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Assim, células aderentes e no sobrenadante de cada poço foram coletadas juntas, lavadas 2x com PBS e em seguida incubadas com 100 uL de tampão anexina contendo 1 uL tanto de PE Annexin V (PE) como de 7-Amino-Actinomycin (7AAD). Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente e protegidas da luz, 100 uL de tampão anexina foram adicionados para análises das amostras por citometria de fluxo. Aquisição de aproximadamente 20.000 eventos totais

para cada amostra foi realizada dentro do período de 1 hora usando o citômetro AccuriTMC6 (BD-Biosciences). As amostras foram analisadas usando o *software* do AccuriTMC6 e o *template* recomendado pelo fabricante do *Kit* para o equipamento utilizado (BD Biosciences, New Jersey, USA).

Células viáveis foram consideradas pelo fenótipo Anexina⁻, 7AAD⁻ (duplo negativas); células apoptóticas foram Anexina⁺ 7AAD⁻, células necróticas foram Anexina⁻ 7AAD⁺ e; células em apoptoses tardia/necrose foram Anexina⁺ 7AAD⁺ (duplo positivas) ([www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols for technical protocols](http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/protocols_for_technical_protocols)).

Coloração de Giemsa

Com o objetivo de avaliar as alterações morfológicas da linhagem celular MCF-7 após tratamentos, células mantidas nas condições de cultura descritas acima foram submetidas à coloração de *Giemsa*, após respectivos tempos. Para isto, lamínulas redondas previamente lavadas e esterilizadas foram adicionadas as placas de 24 poços para posterior plaqueamento das células, conforme descrito acima. Após adesão, células foram tratadas e mantidas nas mesmas condições de tratamento por 24, 48 e 72 horas de cultura. Logo de cada período, lamínulas contendo as células, com os respectivos tratamentos foram lavadas com PBS e logo fixadas com metanol P.A. (Vetec, Brasil) por 5 minutos. Em seguida, corante *Giemsa* (Merck S/A, Brasil) foi adicionado e mantido por 10 minutos. Logo, as células foram lavadas com água deionizada e em seguida secas ao ar, para posterior montagem sobre lâminas contendo uma gota de *entellam*® (Merck, Darmstadt, Germany). Após coloração, lamínulas (2 por tratamento) foram analisadas em microscópio óptico NIKON E200 (Shinagawa, Tokyo, JP), e fotografadas com câmera acoplada NIKON Coolpix (Nikon Inc. USA).

Avaliação da migração e proliferação celular pelo ensaio *wound healing*

Células foram cultivadas em placas de 12 poços na densidade de 1×10^4 células viáveis por poço. Após adesão, células foram lavadas, tratadas e mantidas nas mesmas condições por 24 horas. Logo, com ajuda de uma ponteira de $1000 \mu\text{L}$ foi realizada uma linha constante de ferida na monocamada de células em cada poço de cada condição experimental. Em seguida, sobrenadante de cultura foi descartado e células soltas pelo procedimento foram retiradas eficientemente por lavagens sucessivas dos poços por três vezes com PBS 1%. Após lavagem, meio completo foi adicionado e placas contendo as

células foram observadas em microscópio invertido (ZEISS® Axiovert 40 CFL) e fotografadas poço a poço (tempo 0 horas) utilizando câmera fotográfica profissional (Canon® Power Shot A650 IS). Em seguida, células foram incubadas nas mesmas condições de cultura até 24 horas após de realizada a “ferida”. Novas fotos foram realizadas no tempo 24 horas a fim de verificar crescimento das células tumorais na “ferida” como indicativo de migração. Para quantificação da migração celular para a “ferida” em cada poço, o *software* de processamento de imagem *ImageJ* 1.53a (*Wayne Rasband, National Institutes of Heath, USA*) foi utilizado para calcular a área da lacuna em pixels quadrados, após o desenho manual de uma linha nos limites das células realizada com ajuda de ferramenta do próprio *software*.

Avaliação de citocinas pela técnica de CBA

Sobrenadantes provenientes das culturas de células MCF-7, após seus respectivos tratamentos foram coletados e imediatamente congelados em freezer a -80°C para posteriores análises. Determinação de citocinas inflamatórias (IL-12p70, IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF, IL-10) foi realizada utilizando o *kit Human Inflammatory Cytokine CBA Kit* (BD-Biosciences, San Diego, CA). Para isto, 25 μ L de cada amostra (tanto da curva padrão, quanto das amostras) foram incubadas por 3 horas com 25 μ L de uma mistura de *beads* de captura para cada uma das citocinas e, com 25 μ L do reagente de detecção *Human Inflammatory Cytokine PE*. Após lavagem com 500 μ L da solução fornecida pelo kit, células foram ressuspensas em 150 μ L da mesma solução. Aquisição de 1800 eventos (300 eventos por citocina) para cada amostra foi realizada usando o citômetro FACS Accuri™C6 (BD-Biosciences) conforme *template* disponibilizado para o kit (https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Accuri_Kits_Templates_Catalog.pdf). Análise dos dados foi realizada utilizando o *software* específico de análises para CBA (FCAP Array software – BD Biosciences).

Análise estatística

Para realização das análises estatísticas, todos os dados foram previamente avaliados para inspeção de normalidade e homogeneidade de variâncias, pelos testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respectivamente. O teste utilizado nas análises foi análise de variância ANOVA de dois fatores (*mixed-effects analysys two way ANOVA*), com pós-teste de *Tukey*, quando necessário. Para todos os cálculos, adotaram-se níveis de

significância $\alpha=0,05$, valores de chance de erro foram considerados $*p < 0.05$. Análises e gráficos foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 8.0, para o WindowsTM (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

Potências homeopáticas de *Phytolacca decandra* exibem comportamentos semelhantes à Doxorrubicina em relação a viabilidade das células MCF-7

As análises de viabilidade realizadas por citometria de fluxo (Anexina⁻, 7AAD⁻) (Figura 1A e 1B) apresentaram a interação entre as variáveis ($F_{(10,36)}=68,80$, $p<0,05$, $\alpha=0,05$). Após 24 horas do tratamento com as potências de *Phytolacca decandra* 30CH (média= 87,2%, $p<0,05$) e 200CH (média= 85,6%; $p<0,05$) e Doxo (média=77,8%; $p<0,05$) células MCF-7 apresentam aumento na sua viabilidade quando comparadas com as células não tratadas do grupo controle (média=41,4%). Para as análises das mesmas condições de tratamento após 48 horas o tratamento e 72 horas mostraram que a Doxorrubicina apresenta dramática redução da viabilidade das células após ambos os períodos de tratamento (média_(48h)=1,5%; $p=0,69$ e média_(72h)=2,9%; $p<0,05$). As potências homeopáticas 30CH (média_(48h)= 52,7%; $p=0,13$ e média_(72h)=30,2% ; $p=0,25$) e 200CH (média_(48h)=38,8%; $p<0,05$ e média_(72h)=26,8%; $p<0,21$) apresentam comportamento semelhante a Doxorrubicina com diminuição da viabilidade em ambos os tempos, porém de forma sutil apresentando diferença significativa entre o grupo controle não tratado e o grupo 200CH no tempo de 48 horas. Em paralelo, o tratamento das células com *Phytolacca decandra* tintura-mãe (média_(24h)=35,1%; $p=0,93$; média_(48h)=18,7%; $p=0,50$; média_(72h)=37,1%; $p>0,99$) não apresentaram diferenças em relação ao número de células viáveis quando comparadas com o grupo controle sem tratamento. Interessantemente o comportamento da curva de cada tratamento apresentou padrões distintos com os seguintes valores para equação da reta e R^2 , sendo para o grupo controle sem tratamento: $y = -0,0776x + 40,301$ e $R^2 = 0,1111$; para o grupo 30 CH: $y = -1,1872x + 113,7$ e $R^2 = 0,9853$; para o grupo 200 CH: $y = -1,2257x + 117,56$ e $R^2 = 0,9783$; para o grupo tintura-mãe: $y = 0,0415x + 28,287$ e $R^2 = 0,0097$; e para o grupo álcool: $y = 0,0455x + 24,23$ e $R^2 = 0,1155$; e grupo Doxorrubicina $y = -1,5623x + 102,38$ e $R^2 = 0,7365$. Esta curva de tendência apresentada na Figura 1B sugere que a viabilidade das células após tratamentos com potências homeopáticas tende a diminuir em função do tempo em relação ao grupo controle, entretanto por limitações do modelo de cultura celular não realizamos o acompanhamento para os tempos subsequentes.

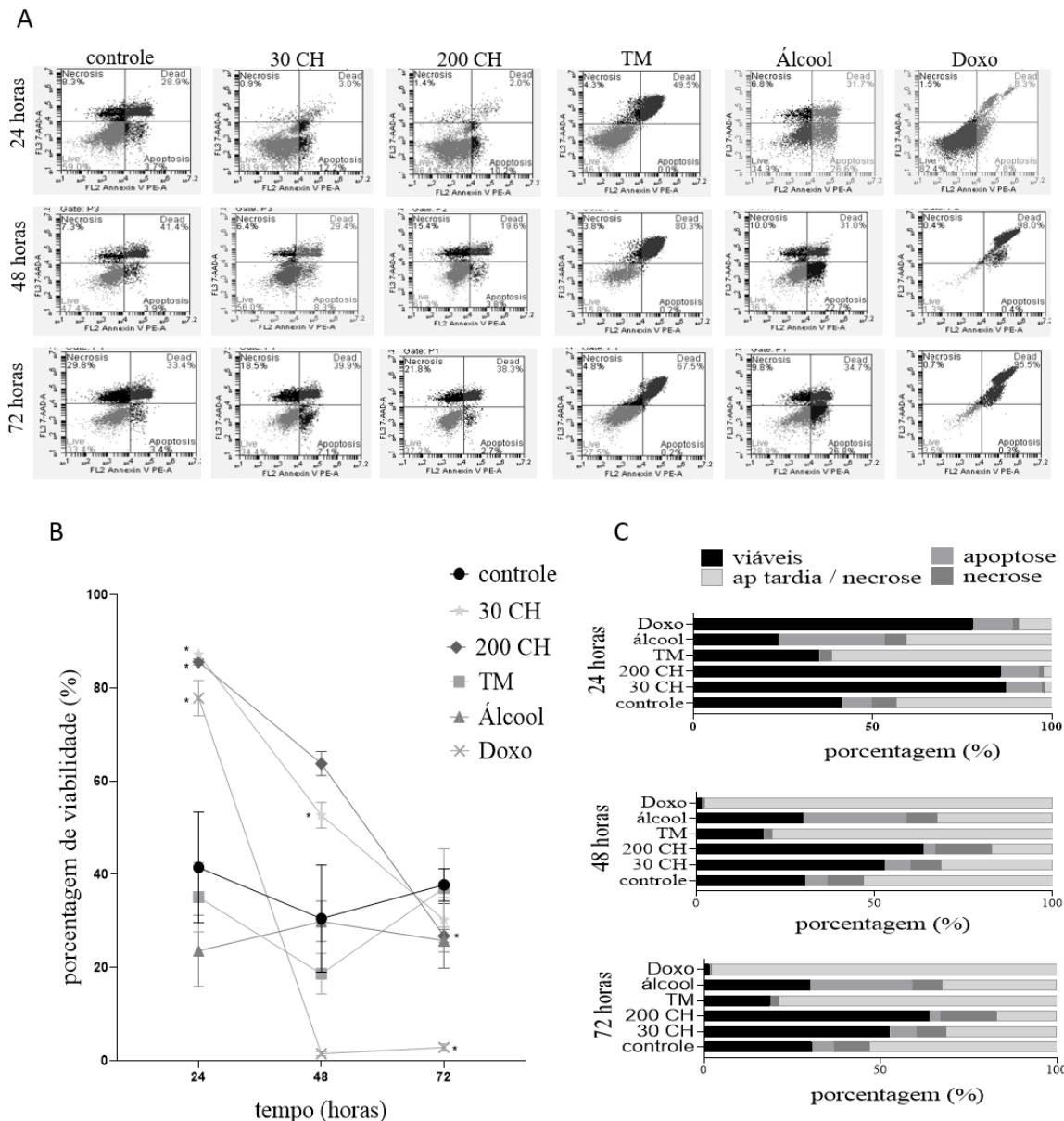


Figura 1. **A** – *Dot-plots* dos resultados obtidos nas análises de citometria de fluxo das células MCF-7 cultivadas em meio completo R10 (R10) tratadas com diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* 30CH (30CH), 200CH (200CH) ou a tintura-mãe (TM), álcool (álcool), ou 3 μ g/mL de Doxorrubicina (Doxo) após 24, 48 e 72 horas de tratamento. *Gates* representam as porcentagens de células viáveis (Anexina⁻ 7AAD⁻), em apoptose (Anexina⁺ 7AAD⁻), em necrose (Anexina⁻ 7AAD⁺) ou em apoptose tardia/necrose (Anexina⁺ 7AAD⁺). **B** – Representação gráfica do percentual de viabilidade das células MCF7 em cada tratamento após 24, 48 e 72 horas de cultura. **C** – Representação em barras da distribuição das células MCF-7 viáveis, em apoptose, em necrose ou em apoptose tardia/necrose após 24, 48 e 72 horas de cada tratamento. Teste utilizado ANOVA de dois fatores (*mixed-effects*), pós-teste de *Tukey* em relação ao grupo não tratado (controle). (R10). * indica $p < 0,05$, barras representam desvio padrão.

As análises de apoptose realizadas por citometria de fluxo (Anexina⁺ / 7-AAD⁻) apresentaram a interação entre as variáveis ($F_{(10,36)}=12,05$, $p<0,05$, $\alpha=0,05$) representados na figura 1C sugerindo aumento significativo da porcentagem de apoptose em relação ao tempo para os tratamentos 30CH (média_(24h)=9,7%; média_(48h)=7,4%; média_(72h)=4,8%;

$p_{(24-72h)} < 0,05$); 200CH (média_(24h)=10,7%; média_(48h)=3,17%; média_(72h)=2,0%; $p_{(72h)} < 0,05$). O grupo de tratamento álcool, apresenta os maiores valores de apoptose nos três tempos estudados com diferenças significativas quando comparados ao grupo controle (média_(24h)=29,7%; média_(48h)=28,9%; média_(72h)= 29,3%, $p < 0,05$).

As análises de apoptose tardia/necrose realizadas por citometria de fluxo (Anexina⁺/7-AAD⁺) apresentaram a interação entre as variáveis ($F_{(10, 36)} = 65,73$, $p < 0,05$, $\alpha = 0,05$), representados na figura 1C sugerindo o aumento significativo da porcentagem de apoptose tardia/necrose em relação ao tempo, efeito este evidenciado nos grupos tratados com *Phytolacca decandra* nas diluições homeopáticas 30CH (média_(24h)=2,13%; média_(48h)=31,3%; média_(72h)=50,2%; $p_{(24-72h)} < 0,05$); 200CH (média_(24h)=2,4%; média_(48h)=17,2%; média_(72h)=54,4%; $p_{(72h)} < 0,05$) e Doxo (média_(24h)=9,5%; média_(48h)=97,8%; média_(72h)=96,2%; $p_{(72h)} < 0,01$). O principal mecanismo de morte para todos os grupos de tratamento aqui analisados enquadram-se neste *gate* indicando apoptose tardia/necrose (Anexina⁺ / 7-AAD⁺).

As análises de necrose realizadas por citometria de fluxo (Anexina⁻/7-AAD⁺) apresentaram a interação entre as variáveis ($F_{(10, 54)} = 13,21$, $p < 0,05$, $\alpha = 0,05$), observou-se o efeito de interação entre tempo representados na figura 1C, sugerindo o aumento significativo da porcentagem de necrose em relação ao tempo e as médias dos todos os tratamento mantém-se menores que o grupo não tratado e a necrose foi o mecanismo de morte celular que foi menos observado. (media-controle=13,2%; média-TM=3,4%; média-álcool=7,7%; média-30CH=8,1; média-200CH=11,2%; média-Doxo=0,9%) e que somente os grupo TM ($p < 0,05$), Doxo ($p < 0,05$) e álcool ($p < 0,05$) apresentam diferenças estatísticas quando comparadas ao grupo não tratado.

Tratamento com diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* não induzem alterações morfológicas relevantes nas células MCF-7

Conforme mostrado na Figura 2, análises microscópicas da coloração com *Giemsa*, indicam que células MCF-7 não apresentaram alterações morfológicas relevantes após tratamento com as potências 30CH e 200CH, quando comparadas ao grupo controle (Figura 2, linhas 1, 2 e 3). Nestes grupos, é possível observar que as células mantêm a relação núcleo-citoplasma menor como esperado para células tumorais, com membrana citoplasmática organizada, mantendo a coesão intercelular, com núcleo de cromatina dispersa e nucléolos evidentes. No tempo de 72 horas, as células tratadas pelas potências homeopáticas apresentaram discreta degeneração hidrópica, com a presença de

vacúolos intracelulares, indicando um início do processo de degeneração vacuolar, especialmente para a potência 200CH, onde também é observada maior quantidade de nucléolos e alguns núcleos picnóticos. Já nos tratamentos TM, álcool e Doxo (Figura 2, linhas 4, 5 e 6) é possível observar nos tempos de 48 e 72h, alterações morfológicas relevantes sugestivas de sofrimento/morte celular como: células menores, com vacuolização citoplasmática e presença de estruturas semelhantes a corpos apoptóticos (grupo *Phytolacca decandra* tintura-mãe), condensação nuclear (grupo álcool, tempos 24 e 48 horas). Em contraste, no grupo álcool às 72 horas, as células se reestabelecem ao padrão do grupo sem tratamento. Já no grupo Doxo, as células apresentam alteração da conformação da membrana plasmática com degeneração citoplasmática, hipercromasia, presença de núcleos picnóticos (condensação da cromatina), característicos de degeneração nuclear e necrose.

O número de nucléolos nas células após cada tratamento foi calculado e seguido da análise apresentaram a interação entre as variáveis ($F_{(10, 1782)} = 7,085$, $p < 0,05$, $\alpha = 0,05$), observou-se o efeito de interação entre tempo representados na figura 1C, sendo a médias entre os tempos para os grupos Controle (média=3,4 núcleo/cél), TM (média=1,8 núcleo/cél; $p < 0,05$), Álcool (média=2,2 núcleo/cél; $p < 0,05$), 3CH (média=3,0 núcleo/cél; $p < 0,01$), 200CH (média=3,5 núcleo/cél; $p = 0,86$), Doxo (média=0,2 núcleo/cél; $p < 0,05$), a redução de número de núcleos por célula é mais evidente no grupo Doxo.

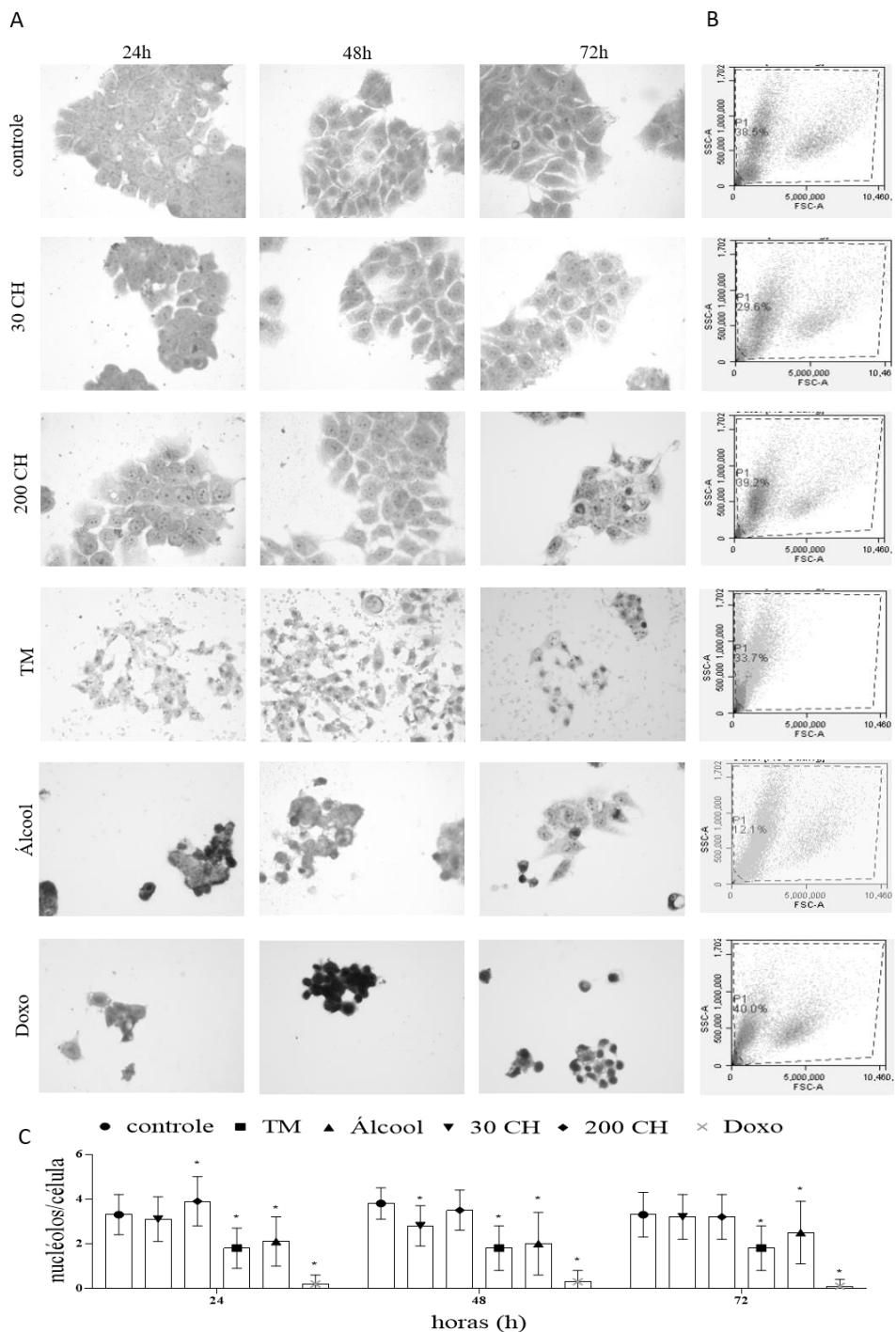


Figura 2. **A** - Fotomicrografias de lamínulas coradas pelo método de *Giemsa* com células MCF-7 cultivadas em meio completo R10 (controle), tratadas com diluições de *Phytolacca decandra* 30CH (30CH), 200CH (200CH) ou tintura-mãe (TM) ou álcool (álcool) ou 3ug/mL de Doxorrubicina (Doxo) por 24 , 48 e 72 horas de cultura. **B** – Dot plots de análises de citometria de fluxo, representativos do tamanho vs granulosidade das populações celulares presentes em cada tratamento após XX2 horas de cultura. **C** – Contagem de nucléolos por célula em cada grupo de tratamento, contados a partir das respectivas fotomicrografias. ANOVA de dois fatores (*mixed-effects*) com pós-teste de *Tukey* em relação ao grupo controle; * representa $p < 0,05$, barras representam desvio padrão. Dados representativos de quadruplicatas experimentais.

Tratamento com diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* não induzem alterações no padrão de migração das células MCF-7

Avaliação da capacidade de migração das células MCF-7 foi determinada antes e após o tratamento por 24 horas com diluições de *Phytolacca decandra* 30CH (30CH), 200 CH (200CH) ou tintura-mãe (TM) ou álcool (álcool) ou 3ug/mL de Doxorrubicina (Doxo), calculou-se as áreas em pixels das feridas e análise apresentaram a interação entre as variáveis ($F_{(5, 17)} = 4,075$, $p < 0,13$, $\alpha = 0,05$). Conforme observado na Figura 3, análises das áreas das feridas captadas nas micrografias tomadas nos tempos 0 e 24 horas não apresentam diferenças significativas em relação ao tempo de tratamento (Figura 3B), exceto pelo grupo não tratado controle (média-0h= 3409133 pixels²; média-24h= 2484134 pixels²; $p < 0,05$), portanto todos os tratamento foram efetivos em reduzir a migração das células.

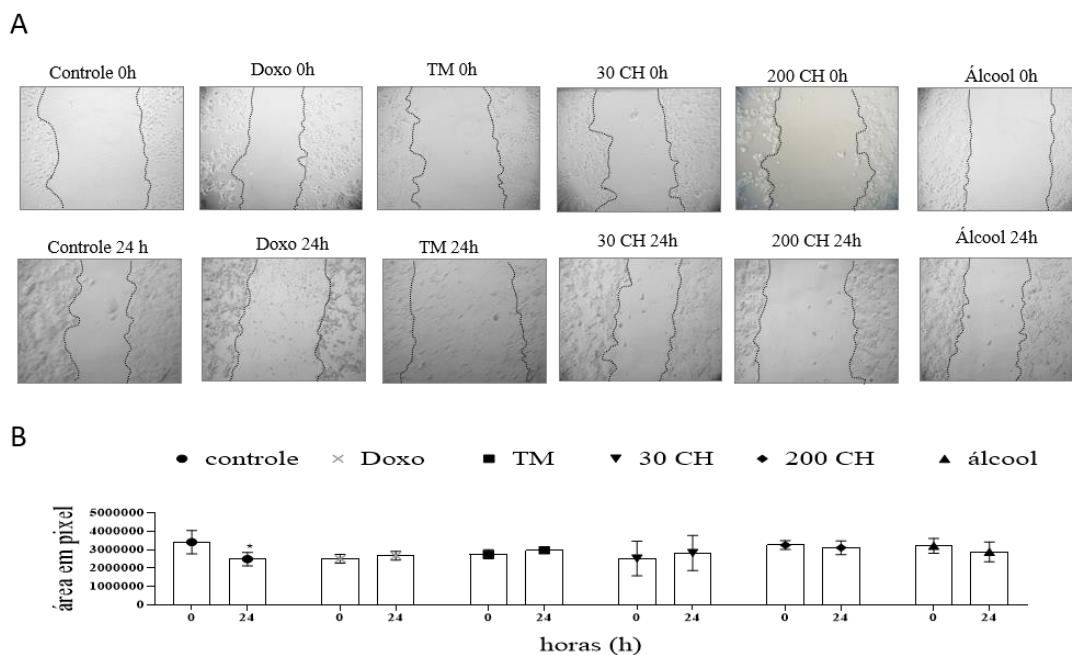


Figura 3. **A** - Fotomicrografias das células MCF-7 cultivadas em placas de 12 poços com meio completo R10 (controle), tratadas com diluições de *Phytolacca decandra* 30CH (30 CH), 200CH (200CH) ou tintura-mãe (TM) ou álcool (álcool) ou 3ug/mL de Doxorrubicina (Doxo), 24 horas antes de realização da ferida no fundo do poço. A ferida corresponde à área livre criada pela ação traumática de ponteira de 1000 uL. **B** – Colunas representam as medias das medidas das áreas em pixels das feridas realizadas nos poços contendo células com os respectivos tratamentos, avaliadas logo após realizada a ferida (tempo 0) e 24 horas após 0 horas e 24 horas de cultura. Analisados pela ANOVA de dois fatores (*mixed-effects*), ($p < 0,1$); * representa diferenças estatísticas entre o grupo controle em seu respectivo tempo, as barras representam desvio padrão. Dados representativos de quadruplicatas experimentais.

Células MCF-7 após tratamento com as potências homeopáticas de *Phytolacca decandra* não apresentam marcante aumento de citocinas inflamatórias

A análises de citocinas inflamatórias IL-12p70, TNF, IL-1 β , IL-8 e anti-inflamatórias IL-10 e IL-6 liberadas nos sobrenadantes de cultura de células MCF-7 cultivadas em meio completo R10 (MCF-7) na presença de diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* 30CH (30CH), *Phytolacca decandra* 200CH (200CH) ou a *Phytolacca decandra* tintura-mãe (TM), ou álcool (álcool) ou 3ug/mL de Doxorrubicina (Doxo) estão representadas na figura 4.

Para a citocina IL-12p70, observou-se efeito principal do tratamento ($F_{(5, 54)}=44,05$, $p<0,05$, $\alpha=0,05$), sendo que o grupo tratado com *Phytolacca decandra* tintura-mãe, no tempo de 72 horas (média_(TM)=3,56pg/mL, $p<0,05$), apresentaram aumento da concentração desta citocina significativa em relação ao grupo não tratado (controle) (média(controle)=0,56).

Para a citocina, TNF observou-se um efeito da interação tempo/tratamento ($F_{(10, 36)}=10,31$, $p<0,05$, $\alpha=0,05$), no grupo Doxo 24h/48 e 24/72h (média₍₂₄₎=1,13 pg/mL; média₍₄₈₎=4,91 pg/mL; média₍₇₂₎=5,63 pg/mL), sugerindo o aumento significativo da expressão de TNF em relação ao tempo. Os demais grupos de tratamento não expressaram a produção da citocina.

Para a citocina, IL-1 β observou-se um efeito da interação tempo/tratamento ($F_{(10, 36)}=6,678$, $p<0,05$, $\alpha=0,05$), sugerindo o aumento significativo da expressão de IL-1 β em relação ao tempo, apenas no grupo Doxo 24h/48 (média₍₂₄₎=0 pg/mL; média₍₄₈₎=8,86 pg/mL; média₍₇₂₎=7,48pg/mL). Não houve expressão desta citocina para os grupos *Phytolacca decandra* nas potencias homeopáticas.

Para a citocina IL-8, observou-se efeito principal do tratamento ($F_{(5, 54)}=15,66$, $p<0,05$, $\alpha=0,05$), sendo que o aumento da produção desta citocina ao longo do tempo para o grupo TM (média₍₂₄₎=7,58 pg/mL; média₍₄₈₎=8,03 pg/mL; média₍₇₂₎=10,6 pg/mL) e Doxorrubicina (média₍₂₄₎=5,93 pg/mL; média₍₄₈₎=8,63 pg/mL; média₍₇₂₎=10,5 pg/mL) em relação ao grupo controle não tratado (média₍₂₄₎=4,92 pg/mL; média₍₄₈₎=5,08 pg/mL; média₍₇₂₎=5,25pg/mL).

Para a citocina, IL-10 observou-se um efeito da interação tempo/tratamento ($F_{(10, 36)}=78,98$, $p<0,05$, $\alpha=0,05$), no grupo Doxo 24h/48 e 24/72h (média₍₂₄₎=0 pg/mL; média₍₄₈₎=4,31 pg/mL; média₍₇₂₎=4,83 pg/mL), sugerindo o aumento significativo da

expressão de IL-10 em relação ao tempo. Os níveis de IL-10, foram indetectáveis nas amostras tratadas com *Phytolacca decandra* nas diluições homeopáticas CH30 e CH 200.

Para a citocina, IL-6 observou-se um efeito do tratamento ($F_{(5, 18)} = 12,83, p < 0,05$, $\alpha = 0,05$), com maior produção desta citocina no tempo de 72 horas para os grupos de tratamento 200CH (média₍₇₂₎=6,69 pg/mL, $p < 0,05$) e Doxo (média₍₇₂₎=7,89 pg/mL, $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (média₍₇₂₎=2,42 pg/mL).

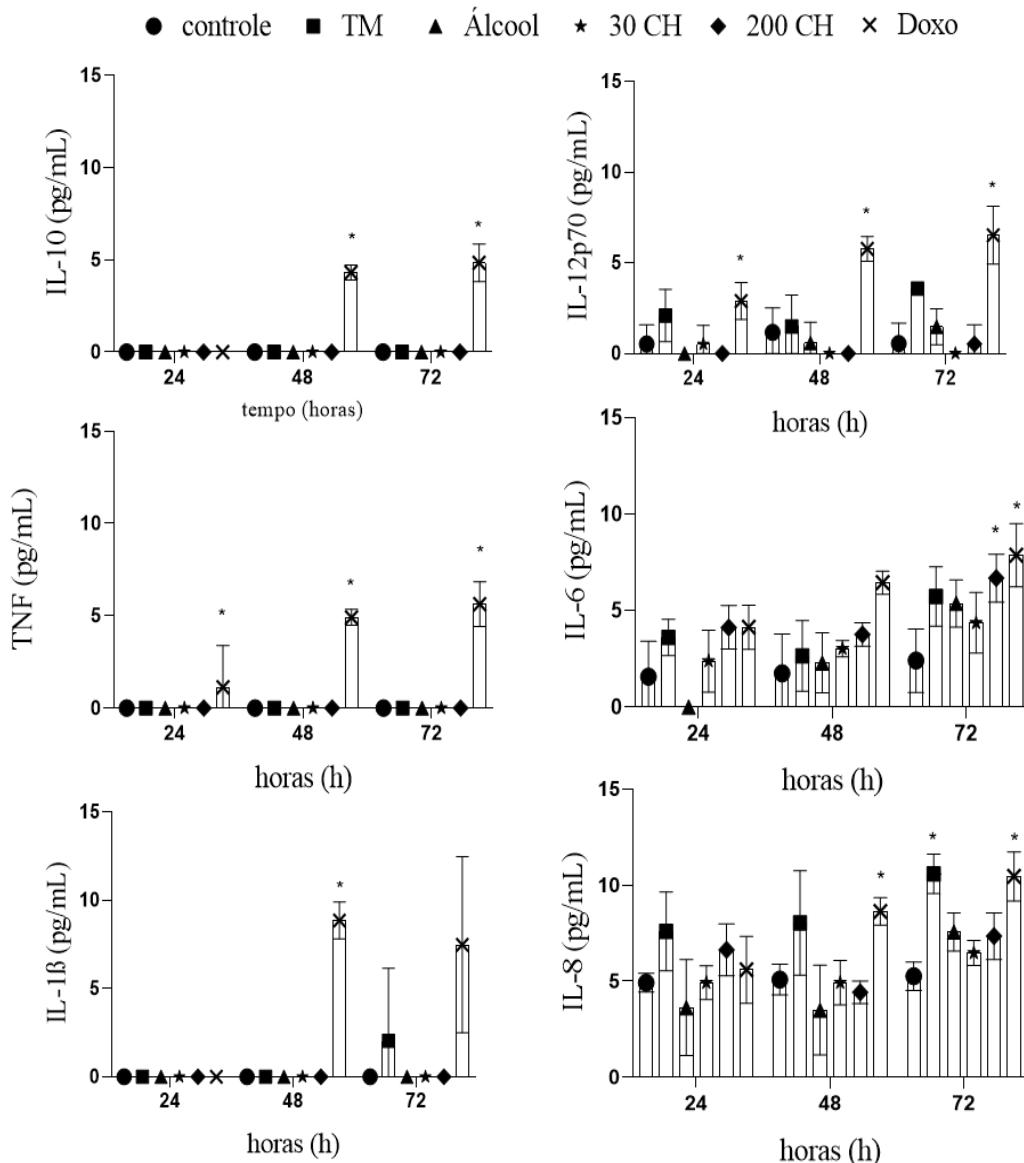


Figura 4 - Perfil de citocinas liberadas por células MCF-7 após tratamentos. Análises de citocinas inflamatórias IL-12p70, TNF, IL-1 β , IL-8 e anti-inflamatórias IL-10 e IL-6 liberadas nos sobrenadantes de cultura de células MCF-7 cultivadas em meio completo R10 (MCF-7) na presença de diluições homeopáticas de *Phytolacca decandra* 30CH (30CH), *Phytolacca decandra* 200CH (200CH) ou a *Phytolacca decandra* tintura-mãe (TM), ou álcool (álcool) ou 3 μ g/mL de Doxorrubicina (Doxo). Colunas representam a média das medidas em pg/mL das citocinas liberadas nos respectivos sobrenadantes de cultura, junto com o erro da produção de cada citocina. Teste ANOVA de dois fatores (*mixed-effects*) com pós-teste de Tukey; * representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, as barras representam desvio padrão. Dados representativos de triplicatas experimentais.

DISCUSSÃO

Homeopatia é uma medicina holística que atua em todo o organismo modulando processos neuro-imunológicos capazes de modular o crescimento e a propagação de células tumorais (BELLAVITE et al., 2015; GHOSH et al., 2013). No presente estudo, foram investigados possíveis mecanismos de ação da *Phytolacca decandra* em diluições homeopáticas no tratamento do câncer de mama. Os resultados observados neste modelo experimental *in vitro* demonstraram mudanças de certos padrões citotóxicos e modulação na produção de citocinas inflamatórias após o tratamento das células tumorais com medicamentos homeopáticos, conforme apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Principais observações das células MCF-7 cultivadas em meio completo R10, na ausência ou presença de diluições de *Phytolacca decandra* 30 CH, 200 CH, ou tintura-mãe (TM), álcool (álcool) e Doxorrubicina.

	Controle (Sem tratamento)	<i>Phytolacca</i> <i>decandra</i> 30 CH	<i>Phytolacca</i> <i>decandra</i> 200 CH	<i>Phytolacca</i> <i>decandra</i> TM	Álcool	Doxorrubicina
Morfologia	-	Degeneração vacuolar (72h)	Degeneração vacuolar (72h)	Corpos apoptóticos	Citotoxicidade transitório	Núcleos condensados
Mortalidade	-	+ tempo dependente	+ tempo dependente	++	+	+++
Apoptose	-	-	-	-	+	-
Necrose	-	-	-	+ 48/72h	+	-
Apoptose tardia /necrose	-	+	+	+	+	++
Citocinas	-	-	IL-6	IL12p70 72h, IL8, IL-1 β , IL 6.	-	IL12p70, IL8, IL- β , IL 6, TNF, IL10).
Migração celular (<i>wound healing</i>)	-	-	-	-	-	-

Conhecidamente, o câncer é uma doença caracterizada por aberrações nas vias apoptóticas. Portanto, a eficácia de um medicamento com ação antitumoral encontra-se estreitamente relacionada à capacidade de indução de apoptose (REED, 2003). Já foi

reportada a ação citotóxica de medicamentos homeopáticos induzindo apoptose (FRENKEL, 2009). Este achado também é suportado por estudos *in vivo* do grupo onde foi demonstrado que camundongos inoculados com células de adenocarcinoma mamário 4T1 reduzem significativamente o crescimento do tumor após o tratamento de *Phytolacca decandra* 30 CH (NOGUEIRA, 2016).

Um dos possíveis mecanismos de ação dos medicamentos homeopáticos pode ser elucidado pelo aumento de citotoxicidade, que está associada à expressão de muitos genes envolvidos no processo de apoptose (GHOSH et al., 2013; KHUDA-BUKHSH; MONDAL; PANIGRAHI, 2014; MANESS, 2012). Em oposição, outros relatos da literatura não encontraram efeitos citotóxicos para cultura de células de câncer de mama das linhagens DU-145 e LNCaP, tratadas com *Phytolacca decandra* 30CH, 200CH e 1000CH e outros medicamento homeopáticos (THANGAPAZHAM et al., 2006).

Aqui é mostrado que as potências homeopáticas 30CH e 200CH de *Phytolacca decandra* induzem morte celular principalmente por apoptose, uma vez que a porcentagem alta de células foi classificada dentro do grupo apoptose tardia/necrose que por limitação da técnica não é possível. Entre as potências estudas não foram evidenciadas diferenças importantes no percentual de morte quando compradas com o grupo controle. Somente, a potência 200CH após 72 horas de tratamento apresentou aumento significativo da mortalidade quando comparada ao grupo controle. Este efeito citotóxico não pode ser atribuído ao álcool, (veículo homeopático, utilizado na concentração final de 0,06%; fator de diluição dos medicamentos no meio de cultura celular, o que permite evitar possíveis efeitos citotóxicos inespecíficos do veículo sobre as células, durante o experimento) e o mesmo não apresentou efeito da interação com o tempo e manteve-se semelhante ao grupo controle.

Por outro lado, quando comparamos as diluições homeopáticas com a tintura-mãe encontramos efeito de mortalidade semelhante, especialmente no tempo 72 horas onde as diluições homeopáticas apresentaram sua melhor performance. Estas considerações estão de acordo com SUNILA e colaboradores (SUNILA et al., 2009). Eles relatam em seu estudo que as preparações homeopáticas demonstram efeitos citotóxicos contra linhagens de câncer de mama, muitas vezes maiores que a atividade da tintura-mãe, o que leva a pensar que a apoptose observada no presente estudo é induzida realmente pela ação de medicamentos homeopáticos e não de seu veículo.

(FRENKEL, 2009), demonstram a ação de quatro soluções ultradiluídas (*Carcinosin*, *Phytolacca*, *Conium*, *Thuja*) contra duas linhagens de célula de

adenocarcinoma mamário humano (MCF-7 e MDA-MB-231) e uma linhagem não tumoral de células humanas de tecido epitelial mamário (HMLE). Este estudo evidenciou efeitos citotóxicos das preparações homeopáticas contra as linhagens celulares de câncer de mama, levando ao atraso ou parada do ciclo celular e apoptose.

(ARORA et al., 2013), avaliaram o efeito dos remédios homeopáticos nas células de câncer de mama, cólon e mama humanas e observaram efeitos altamente significativos, produzindo citotoxicidade e uma diminuição na proliferação celular. Nas culturas homeopáticas tratadas a apoptose foi evidente e achados morfológicos foram notados como o encolhimento celular, a condensação de cromatina e fragmentação de DNA (ARORA; TANDON, 2015).

Os nucléolos são um sub compartimento do núcleo celular, responsável pela síntese de rRNA e com a maquinaria formadora de ribossomos, e quando observados podem ser correlacionados com o ciclo celular. O número de nucléolos é frequentemente maior em células neoplásicas malignas do que em neoplasias benignas e células normais (RIBEIRO; VASCONCELOS; ANDRADE FILHO, 2015). Neste experimento notou-se uma média de 3 nucléolos foram observados tanto nas células não tratadas (controle) como nas tratadas com as potências de *Phytolacca decandra*, em todos os tempos avaliados. Em contraste, correlacionando com os achados das análises morfológicas, grupos tratados com *Phytolacca decandra* tintura-mãe, álcool apresentaram redução no número de nucléolos nos três tempos avaliados, quando comparados ao grupo no tratado.

De acordo com a literatura (COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015) as células MCF-7 quando cultivadas na ausência de estrogênio não apresentam capacidade de metástase, entretanto o ensaio de proliferação e migração celular que evidenciou esta capacidade de migração nas células não tratadas para as células tratadas em contratapartida todos os tratamento testados, (*Phytolacca decandra* tintura-mãe, 30CH, 200CH, álcool e Doxo) não apresentaram migração células, característica esta muito desejado, uma vez que este teste mimetiza a capacidade metastática das células tumorais.

Estudos destacaram o possível envolvimento de citocinas e seus receptores na progressão e metástase do câncer de mama. As citocinas, seus receptores e a interação com glicosaminoglicanos são pontos determinantes e funcionam como pontos de apoio para que as células cancerosas migrem para locais de metástase distantes do tumor inicial (REFERENCIAS). Várias linhas de evidência sugerem que o mecanismo de ação das citocinas no desenvolvimento do câncer envolve a modulação da proliferação, apoptose,

invasão, recrutamento de leucócitos e angiogênese (ALI; LAZENNEC, 2007). Assim, há um interesse significativo no desenvolvimento de estratégias para antagonizar a função de citocinas pró-inflamatórias, com o intuito de interferir na formação de metástases, que atualmente representa a principal causa de morte da maioria dos pacientes.

A inflamação tem um duplo papel na atividade antitumoral ou pró tumoral, dependendo da plasticidade das células imunes. As células inflamatórias operam de forma conflitante: elas podem tanto na inibir como promover o desenvolvimento e progressão do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011, 2011; SHRIHARI, 2017). Assim, aqui, nós investigamos o perfil de expressão de citocinas inflamatórias pelas células MCF-7 tratadas com *Phytolacca decandra* tintura-mãe e nas diluições homeopáticas. Contudo, estudos futuros *in vivo* deverão ser realizados, já que o microambiente tumoral também tem papel preponderante nesse processo.

As citocinas que no presente estudo apresentaram diferenças em relação à Doxo e tintura mãe IL12p70, IL 6 e IL8. Dentre estas a citocina IL-6, que embora tenha sido descrito como anti-inflamatório em algumas configurações, ela também desempenha papéis essenciais na promoção da inflamação e imunidade. Estudos revelam que a alta concentração de IL-6 é indicador de mau prognóstico em pacientes com diversos tipos de câncer, incluso o câncer de mama. A visão predominante do IL-6 no câncer é como um fator-chave da malignidade (VALDIVIA-SILVA et al., 2009).

Os resultados obtidos mostraram que, não houve alteração no padrão de produção de citocinas nas células MCF-7 após o tratamento com ambas as potências de *Phytolacca decandra*. Entretanto, os tratamentos das células MCF-7 com as potências homeopáticas 30CH ou 200C induziram menor produção de citocinas inflamatórias quando comparadas com as citocinas liberadas por células tratadas com *Phytolacca decandra* tintura-mãe e Doxorrubicina. Este achado é relevante, uma vez que a relação de inflamação e câncer geralmente está associada ao pior prognóstico, conforme descrito acima.

Na busca de marcadores de agressividade do câncer, a interleucina-8 tem sido suspeita de desempenhar um papel importante no câncer de mama. Há evidências convincentes associando células senescentes com a progressão maligna dos tumores. A IL-8 tem sido estudada no contexto da migração e invasão do câncer de mama. Ortiz-Montero e colaboradores (2017), demonstraram que tanto as citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 têm a capacidade de induzir propriedades celulares de auto renovação e capacidade de diferenciação, associadas à malignidade em células de câncer de mama agressivas.

Os nossos dados aqui apresentados mostram que a *Phytolacca decandra* nas diluições homeopáticas e tintura-mãe pode ter efeito biológico contra o câncer de mama e como potenciais agentes para o seu tratamento. Entretanto, diferentemente da tintura-mãe, o tratamento com diluições homeopáticas exibe um perfil menos inflamatório daquele apresentado pelo tratamento com o quimioterápico Doxo. Este achado pode estar associado com a diminuição dos efeitos colaterais apresentados por medicamentos alternativos, contrastando com o perfil inflamatório exibido pela Doxorrubicina, quimioterápico de uso convencional. Assim, estes dados em conjunto devem encorajar outras investigações como associações entre potências homeopáticas, entre ciclos quimioterápicos, profiláticos em grupos conhecidamente de risco para o câncer de mama, em modelos animais ou estudos pré-clínicos para a utilização destes medicamentos como parte do tratamento do câncer de mama.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista (UNIP) pela oportunidade da concretização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALI, S.; LAZENNEC, G. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 3–4, p. 401–420, dez. 2007.
- ARORA, S. et al. Anti-proliferative effects of homeopathic medicines on human kidney, colon and breast cancer cells. **Homeopathy**, v. 102, n. 4, p. 274–282, out. 2013.
- ARORA, S.; TANDON, S. DNA fragmentation and cell cycle arrest: a hallmark of apoptosis induced by Ruta graveolens in human colon cancer cells. **Homeopathy**, v. 104, n. 1, p. 36–47, jan. 2015.
- BANERJI, P.; BANERJI, P. The Banerji ProtocolsTM : A New Method of Treatment with Homeopathic Medicines. p. 43, 2016.
- BANERJI, P.; CAMPBELL, D.; BANERJI, P. Cancer patients treated with the Banerji protocols utilising homoeopathic medicine: A Best Case Series Program of the National Cancer Institute USA. **Oncology Reports**, 1 jul. 2008.
- BELLAVITE, P. et al. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. **Homeopathy**, v. 104, n. 2, p. 139–160, abr. 2015.
- BONAMIN, L. V.; ENDLER, P. C. Animal models for studying homeopathy and high dilutions: Conceptual critical review. **Homeopathy**, v. 99, n. 1, p. 37–50, jan. 2010.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.
- COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **ANTICANCER RESEARCH**, p. 8, 2015.
- FRENKEL. Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 36, n. 2, 27 dez. 2009.
- GHOSH, S. et al. Homeopathic mother tincture of Phytolacca decandra induces apoptosis in skin melanoma cells by activating caspase-mediated signaling via reactive oxygen species elevation. **Journal of Integrative Medicine**, v. 11, n. 2, p. 116–124, mar. 2013.

- GONZALEZ-ANGULO, A. M.; MORALES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYI, G. N. Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patients with Breast Cancer. In: YU, D.; HUNG, M.-C. (Eds.). **Breast Cancer Chemosensitivity**. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2007. v. 608p. 1–22.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.
- KHUDA-BUKHSH, A.; MONDAL, J.; PANIGRAHI, A. Anticancer potential of Conium maculatum extract against cancer cells in vitro: Drug-DNA interaction and its ability to induce apoptosis through ROS generation. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. 39, p. 524, 2014.
- MANESS. In Vitro Cancer Research on Ancient Herbal Remedies: A Changing Trend. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 28 ago. 2012.
- NOGUEIRA, L. ESTUDO DOS EFEITOS DE PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DE Phytolacca decandra NA EVOLUÇÃO DE ADENOCARCINOMA MAMARIO EM MODELO MURINO. p. 63, 2016.
- REED, J. C. Apoptosis-targeted therapies for cancer. **Cancer Cell**, v. 3, n. 1, p. 17–22, jan. 2003.
- RIBEIRO, C. V.; VASCONCELOS, A. C.; ANDRADE FILHO, J. DE S. Apoptosis and expression of argyrophilic nucleolus organizer regions in epithelial neoplasms of the larynx. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. 2, p. 158–166, mar. 2015.
- SANTOS, WILLIAN ALVES DOS, S. Efeitos de altas diluições de Phytolacca decandra na viabilidade e expressão do fator HER-2 em Adenocarcinoma mamário murino (4T1) in vitro. **SÃO PAULO**, p. 47, 2018.
- SHRIHARI, T. Dual role of inflammatory mediators in cancer. **ecancermedicalscience**, v. 11, 23 fev. 2017.
- SIEGEL, R. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, n. 4, p. 220–241, jul. 2012.

SPITALE, A. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 4, p. 628–635, abr. 2009.

SUNDQVIST, C. HOMEOPATHY AND CANCER. p. 6, 2020.

SUNILA, E. S. et al. Dynamized Preparations in Cell Culture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–263, 2009.

THANGAPAZHAM, R. L. et al. Effect of Homeopathic Treatment on Gene Expression in Copenhagen Rat Tumor Tissues. **Integrative Cancer Therapies**, v. 5, n. 4, p. 350–355, dez. 2006.

VALDIVIA-SILVA, J. E. et al. Effect of pro-inflammatory cytokine stimulation on human breast cancer: Implications of chemokine receptor expression in cancer metastasis. **Cancer Letters**, v. 283, n. 2, p. 176–185, out. 2009.

ANEXO

Rastreabilidade dos medicamentos homeopáticos.

Data da Manipulação	Medicamento	Nº Ficha de Pesagem	Lote Insumo ativo	Lote Insumo inerte	Insumo inerte
18/03/2019	Phytolacca decandra - Tintura mãe	948300-0	6140	-----	-----
	Phytolacca decandra 2CH	948300-1	PHY1CH140119	1359990	Álcool a 30% (v/v)
	Phytolacca decandra 29CH	948300-2	PHY23CH030418	1359990	Álcool a 30% (v/v)
	Phytolacca decandra 199CH	948300-3	PHY198CH240522	1359990	Álcool a 30% (v/v)