

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE PREPARAÇÕES
HOMEOPÁTICAS DE *Viscum album* SOBRE
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO**

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

PRISCILA INHAUSER BALTUILLE DO PRADO

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE PREPARAÇÕES
HOMEOPÁTICAS DE *Viscum album* SOBRE
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

PRISCILA INHAUSER BALTUILLE DO PRADO

São Paulo

2021

Prado, Priscila Inhauser Baltuille do.

Avaliação *in vitro* do efeito de preparações homeopáticas de *Viscum album* sobre células de melanoma murino / Priscila Inhauser Baltuille do Prado. - 2021.

67 f. : il.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular: Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos

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

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

1. Câncer de pele. 2. Medicina complementar. 3. *Abies alba*.
4. *Quercus robur*. 5. Ultradiluições. I. Hurtado, Elizabeth Cristina Perez (orientadora). II. Bonamin, Leoni Villano (coorientadora)
III. Título.

ATA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL
DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Arguição do (a) candidato (a) **Priscila Inhauser Baltuille Do Prado** na sessão pública da defesa da dissertação de mestrado: ***AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO DE PREPARAÇÕES HOMEOPÁTICAS DE *Viscum album* SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.***

BANCA EXAMINADORA	NOTA	ASSINATURA
Prof.(a) Dr.(a) LEONI VILLANO BONAMIN - UNIP	_____	_____
Prof.(a) Dr.(a) CARLA HOLANDINO - UFRJ	_____	_____
Prof.(a) Dr.(a) ELIZABETH CRISTINA PEREZ HURTADO - UNIP	_____	_____

Orientador(a)

Média _____ / _____

São Paulo, 30 de Junho de 2021

Presidente da Banca Examinadora
Dr.(a) ELIZABETH CRISTINA PEREZ HURTADO

Observação: Se os membros da banca sugerirem alteração na Dissertação e/ou Tese, o aluno deverá entregar uma emenda, assinada por ele e pelo orientador, em até 30 (trinta) dias corridos, para a Secretaria de Pós-Graduação e deverá trocar somente o CD-ROM com as informações sobre a sua Dissertação e/ou Tese alterada.

Via do Aluno

Ao sempre feliz e amado cão, Thor (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – PROSUP) pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista (UNIP) por viabilizar este estudo.

Às Profas. Dras. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado e Leoni Villano Bonamin por suas orientações e ensinamentos tão valiosos.

À Profa. Dra. Carla Holandino pelo fornecimento das tinturas mães e por compartilhar seus incríveis conhecimentos e entusiasmo sobre as mesmas.

Ao Prof. Dr. Stephan Baumgartner pela disposição de ajuda e por suas enormes colaborações no campo da pesquisa homeopática.

À farmácia HN Cristiano por aviar as diluições homeopáticas.

Aos “alunos da Beth” e aos colaboradores do Centro de Pesquisa da UNIP por auxiliarem da melhor maneira possível e sempre que necessário.

Aos amigos Thais Cristina e Saulo por suas valiosas ajudas.

Ao meu esposo César por tanto auxílio, incentivo e companheirismo em todos os momentos, sem os quais teria sido impossível.

Aos meus pais, Carlos e Valéria, e minha irmã Anna Paula pela paciência, apoio e pelo cuidado e carinho com os meus animais.

RESUMO

O melanoma é responsável pela maioria das mortes por câncer de pele, tendo alto potencial metastático, tratamento difícil e prognóstico reservado. O extrato de *Viscum album* (VA) é usado como terapia complementar no tratamento de pacientes oncológicos, com efeitos citotóxicos *in vitro* e *in vivo* sobre diversos tipos tumorais. No entanto, os efeitos e mecanismos de ação de preparações ultradiluídas do VA precisam ser melhor compreendidos. Assim, verificamos *in vitro* a ação de ultradiluições de VA das subespécies *V. album abietis* e *V. album album* em diferentes escalas e potências sobre células de melanoma murino. Para a Fase I, tinturas mães de VA coletadas das árvores hospedeiras *Abies alba* e *Quercus robur*, tanto no verão quanto no inverno, foram dinamizadas nas escalas decimal (DH), centesimal (CH) e cinquenta-millesimal (LM). Células de melanoma murino B16F10 foram incubadas com a tintura mãe (TM) ou as potências de VA na 3DH, 12DH, 30DH, 6CH, 12CH, 200CH, 2LM, 3LM ou 5LM por 1, 24, 48, e 72 horas de tratamento para as análises de citotoxicidade pelos ensaios de MTT e Cristal Violeta (atividade mitocondrial e viabilidade celular, respectivamente). Foram então selecionadas para a Fase II, as TMs de *Abies alba* e *Quercus robur*, colhidas no verão, e suas diluições homeopáticas 12DH, 200CH e 5LM, para as avaliações de marcadores de morte por apoptose (Anexina) ou necrose (7AAD), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas do perfil inflamatório, morfologia celular e capacidade migratória. Resultados obtidos mostram que as TMs de *Abies alba* e *Quercus robur*, ambas de verão, promoveram diminuição do metabolismo celular, alta citotoxicidade, com alterações morfológicas significativas e produção de altos níveis de EROs e de citocinas inflamatórias. As diluições homeopáticas 12DH, e 5LM, derivadas destas tinturas mães, apresentaram comportamentos de modulação dos processos celulares, tanto com relação ao metabolismo, quanto com relação à replicação e estresse oxidativo, além de alterações nos padrões de inflamação, mitose e migração. Já as homeopatas 200CH apresentaram citotoxicidade e altos níveis de EROs em *Quercus robur* e *Abies alba* respectivamente. Os dados obtidos com as ultradiluições homeopáticas de VA são inéditos e fornecem bases para a compreensão dos mecanismos de ação destes medicamentos, reforçando ainda a necessidade de outros estudos sobre seus efeitos antineoplásicos.

Palavras-chave: câncer de pele, *Abies alba*, *Quercus robur*, ultradiluições, medicina integrativa.

ABSTRACT

Melanoma is responsible for most skin cancer deaths. It has a high metastatic potential, complex treatment, and a hopeless prognosis. The *Viscum album* extract (VA) is a complementary treatment in oncologic patients with *in vitro* and *in vivo* cytotoxic effects on several tumor types. However, high diluted homeopathic preparations' effects and mechanisms need further study. Thus, this study aims to assess the *in vitro* effects of high diluted VA from the subspecies *V. album abietis* and *V. album album* at different scales and potencies on murine melanoma. For Phase I, VA mother tinctures harvested from host trees *Abies alba* and *Quercus robur*, in summer and winter, were dynamized in decimal (DH), centesimal (CH), and fifth-millesimal (LM) scales. B16F10 murine melanoma cells were incubated with the mother tinctures (MT) or VA potencies of 3DH, 12DH, 30DH, 6CH, 12CH, 200CH, 2LM, 3LM, or 5LM for 1, 24, 48, and 72 hours of treatment, for cytotoxicity analysis by MTT and Violet Crystal (mitochondrial activity and cell viability, respectively) assays. Were selected for Phase II, the TMs of *Abies alba* and *Quercus robur*, harvested in the summer, and their homeopathic dilutions 12DH, 200CH and 5LM, for evaluation of cell apoptosis (Anexin) and necrosis (7AAD) markers, reactive oxygens species (ROS) production, inflammatory cytokines profile, cell morphology and migratory capacity. Results obtained show that the MTs of summer harvested *Abies alba* and *Quercus robur* promoted a decrease in cell metabolism and higher cytotoxicity, with significant morphological changes and increased production of ROS and inflammatory cytokines. Their homeopathic dilutions 12DH and 5LM showed metabolism, cell replication, and oxidative stress modulation, along with inflammatory cytokines, mitosis, and migration pattern changes. The 200CH homeopathies, on the other hand, showed increased cytotoxicity and ROS levels in *Quercus robur* and *Abies alba*, respectively. The data obtained with homeopathic high dilutions of VA are unprecedented, and provide a basis for understanding the mechanisms of action of these remedies, reinforcing the need for further studies on their antineoplastic effects.

Keywords: skin cancer, *Abies alba*, *Quercus robur*, high dilutions, integrative medicine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Hipóteses	13
1.2 Justificativa	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Medicamentos, veículos e cegamento.	15
3.2 Cultura celular	15
3.3 Viabilidade celular pelo método de exclusão por <i>Trypan blue</i>	16
3.4 Atividade metabólica por ensaio de MTT (tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide).	16
3.5 Ensaio de Viabilidade por Cristal Violeta	17
3.6 Análises de apoptose e necrose por citometria de fluxo (Anexina – 7AAD)	17
3.7 Avaliação de espécies reativas de oxigênio por sonda DCFH-DA	18
3.8 Avaliação de citocinas pela técnica de CBA (<i>Cytometric Bead Array</i>)	18
3.9 Morfologia celular por coloração de Giemsa	19
3.10 Ensaio de migração celular – <i>Wound Healing</i>	19
3.11 Análise estatística	20
3.12 Delineamento experimental	20
3.12.1 Etapa I. Seleção de ultradiluições de VA com potencial efeito citotóxico sobre células tumorais.	20
3.12.2 Etapa II. Avaliação dos mecanismos de ação das ultradiluições de VA com potencial citotóxico sobre células tumorais.	22
4 RESULTADOS	25

4.1 Análises da atividade metabólica das células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de <i>Viscum album</i> pelo ensaio de MTT (tetrazolium salt3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). _____	25
4.2 Análises de viabilidade das células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de <i>Viscum album</i> (Ensaio de cristal violeta). _____	28
4.3 Análises de apoptose e necrose em células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de <i>Viscum album</i> (Anexina – 7AAD). _____	31
4.3.1 Viabilidade Celular _____	31
4.3.2 Apoptose _____	32
4.3.3 Apoptose tardia/Necrose _____	33
4.3.4 Necrose _____	34
4.4 Análises de produção de EROs por células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de <i>Viscum album</i> (Sonda DCFH-DA). _____	40
4.5 Análises da produção de citocinas inflamatórias por células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de <i>Viscum album</i> (CBA). _____	43
4.6 Análises morfológicas das células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de <i>Viscum album</i> (coloração de GIEMSA). _____	47
4.7 Análises da capacidade de migração das células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de <i>Viscum album</i> (Wound Healing). _____	49
5 DISCUSSÃO _____	53
6 CONCLUSÃO _____	62
REFERÊNCIAS _____	63

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia maligna de melanócitos, células produtoras de pigmentos neuroectodérmicos (melanina), encontradas em todo o corpo (SCHADENDORF et al., 2015). É um câncer potencialmente letal que ocorre, mais comumente, de forma cutânea e sua incidência mundial tem aumentado rapidamente ao longo dos últimos 50 anos, sendo responsável pela maioria das mortes por câncer de pele, ainda que represente menos de 5% destas (MATTHEWS et al., 2017). Quando diagnosticado precocemente, a ressecção da lesão é suficiente para promover taxas de sobrevida favoráveis. No entanto, trata-se de um câncer de caráter agressivo que tende à metástase. Uma vez que isto ocorre, a cirurgia não é mais suficiente e a doença se torna difícil de tratar (MATTHEWS et al., 2017).

O melanoma metastático é um câncer resistente à quimioterapia, de alta letalidade, com taxas de sobrevida de 6 a 9 meses após diagnóstico (HODI et al., 2010). Porém em 2011, com novas terapias e imunoterapias direcionadas, um grande avanço nos tratamentos foi alcançado, aumentando a sobrevida para 5 anos (UGUREL et al., 2017). Entretanto, apesar da alta eficácia, os custos elevados destas terapias tornam restrito seu uso (SEKULOVIC et al., 2018).

Com o intuito de minimizar tanto os custos como os efeitos colaterais dos tratamentos convencionais, a procura por tratamentos de medicina complementar e integrativa tem aumentado na última década (BAGOT, LEGRAND, THEUNISSEN, 2021). Várias técnicas têm sido utilizadas por uma porcentagem substancial de pacientes que tentam melhorar sua qualidade de vida e contribuir com o resultado da terapia convencional (FRASS et al., 2015; SHARMA; SHARMA, 2019; BAGOT, LEGRAND, THEUNISSEN, 2021).

Preparações fermentadas do extrato de Visco (*Viscum album*) vêm sendo usadas, de acordo com parâmetros antroposóficos como terapia complementar no tratamento de pacientes oncológicos há aproximadamente 100 anos (FELENDÁ; TUREK; STINTZING, 2019). Embora a eficácia clínica do *Viscum album* (VA) como adjuvante no tratamento anticâncer e os benefícios associados à sobrevivência continuem sendo contestados, muitos estudos demonstram suas propriedades antitumorais e imunomoduladoras (DE CARVALHO, 2015; BONAMIN; DE CARVALHO; WAISSE, 2017; HOLANDINO et al., 2020).

Pesquisas demonstram que preparações fermentadas do extrato de VA promoveram, *in vitro*, efeitos citotóxicos com presença de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA sobre células de melanoma B16F10 (BONAMIN; DE CARVALHO; WAISSE, 2017). Já em estudos

in vivo demonstraram que o Visco, em diferentes potências homeopáticas, induziu efeito antiangiogênico, com redução do volume tumoral e necrose em melanoma murino (BONAMIN; DE CARVALHO; WAISSE, 2017; BONAMIN; WAISSE, 2019).

O preparo dos extratos de VA segue rígidos parâmetros antroposóficos e científicos que levam em consideração a árvore hospedeira e a época do ano para realizar a colheita, o que tem sido feito da mesma forma para o preparo das Tinturas Mães (TM) de medicações homeopáticas de VA (FELENDÁ et al., 2019). Dentre as principais espécies de hospedeiros de VA estão as árvores: *Malus domestica*, *Quercus sp.*, *Ulmus sp.*, *Pinus sylvestris* e *Abies alba*. Pesquisas com VA parasita de *Malus domestica*, *Quercus sp.* e *Abies alba* colhido no verão evidenciam maior índice de viscotoxinas, já naquelas colhidas no inverno houve maior concentração de lectinas. (HOLANDINO et al., 2018; HOLANDINO et al., 2020).

Com o intuito de eliminar possíveis efeitos colaterais associados à concentração dos compostos presentes nos extratos, a ultradiluição de substâncias é empregada. Este procedimento é uma das bases das preparações homeopáticas. Sendo que a Homeopatia é considerada uma modalidade terapêutica complementar, que foi desenvolvida há cerca de 200 anos pelo médico alemão Samuel Hahnemann, fundamentada no princípio de cura pelo semelhante – *Similia similibus curantur* (FRASS et al., 2015; SHARMA; SHARMA, 2019; FELENDÁ; TUREK; STINTZING, 2019; DOS SANTOS et al., 2020).

Nos últimos anos, diversos estudos têm descrito o uso de medicamentos homeopáticos no tratamento de pacientes oncológicos, seja para diminuir efeitos colaterais ou melhorar o desempenho de tratamentos convencionais ou ainda, para aumentar a sobrevida e qualidade de vida dos indivíduos com câncer (DE CARVALHO; PORTO; BONAMIN, 2013; REMYA; KUTAN, 2015; BAGOT, 2021). Nesse contexto, estudo com o modelo de tumor ascítico de Ehrlich, em camundongos, mostrou que o uso de VA em diluições alternadas conferia melhora notável na qualidade de vida desses animais com melhora das populações celulares especialmente linfócitos T CD4+ e CD8+, para níveis comparáveis aos dos animais livres de tumor, sugerindo possível incremento na resposta imune contra o câncer (DE CARVALHO et al., 2015; BONAMIN; WAISSE, 2019). Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários tanto para avaliar os efeitos em outras linhagens tumorais como para melhor compreensão dos mecanismos de ação das diferentes escalas de potência desses medicamentos.

1.1 Hipóteses

Pesquisas mostram que preparações feitas com o extrato de *Viscum album* têm efeito citotóxico e antitumoral. Entretanto, as ultradiluições homeopáticas destes compostos teriam a capacidade de produzir algum efeito sobre células de melanoma?

1.2 Justificativa

Sendo o melanoma um câncer de distribuição global, alta letalidade e difícil tratamento, técnicas terapêuticas que promovam auxílio à terapia convencional ou ainda, que por si só, possam proporcionar melhor qualidade e expectativa de vida aos pacientes, devem ser investigadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar *in vitro* os efeitos de diferentes diluições homeopáticas de *Viscum album* sobre células de melanoma murino B16F10.

2.2 Específicos

- Investigar possíveis diferenças nos efeitos dos extratos de VA obtidos de hospedeiros diferentes (*Quercus robur.* e *Abies alba.*) e colhidos nas estações de inverno e verão sobre células de melanoma B16F10;
- Avaliar os efeitos dos medicamentos homeopáticos de *Viscum album* preparados em diferentes escalas de diluição sobre células de melanoma B16F10;
- Contribuir para a compreensão do modo de ação das ultradiluições homeopáticas de VA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Medicamentos, veículos e cegamento.

As tinturas mães de VA utilizadas no estudo foram disponibilizadas gentilmente pela Profa. Dra. Carla Holandino da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Estas TMs foram preparadas conforme a farmacopeia homeopática brasileira, a partir de plantas colhidas das árvores hospedeiras *Quercus robur* e *Abies alba*, nas estações do verão e do inverno e foram encaminhadas para a farmácia homeopática HN Cristiano, em São Paulo, para obtenção das ultradiluições homeopáticas. Para o *screening* prévio da Fase I foram utilizadas 3 potências de cada uma das escalas de diluição, sendo da escala decimal as potências 3DH, 12DH e 30DH; da escala centesimal: 6CH, 12CH e 200CH; e da escala cinquenta milesimal: 2LM, 3LM e 5LM. Além dessas diluições homeopáticas e tinturas mães, as células foram também tratadas com os veículos (água sucucionada, álcool 0,3%; dinamizado e não dinamizado) e com o quimioterápico carboplatina (B-platin – Blausiegel®) na concentração de 10%. Como controle negativo, células B16F10 foram mantidas somente com meio completo nos períodos correspondentes sem adição de nenhum tratamento. As amostras foram cegadas no laboratório da instituição, por pesquisadores não envolvidos no projeto. Para isto, os rótulos de todos os medicamentos foram substituídos por códigos desconhecidos pela equipe, sendo estes códigos revelados somente após a análise estatística.

3.2 Cultura celular

A linhagem de células de melanoma murino B16F10 foi cultivada em garrafas de cultura com meio completo contendo: meio RPMI – 1640 (Gibco – Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco – Thermo Fisher Scientific), 1% antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco – Thermo Fisher Scientific), em incubadora (Thermo Fisher) a 37°C com 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa. Para coleta, as células foram submetidas a breve exposição à tripsina (Thermo Fisher) e inativação com meio completo.

Para os ensaios da Etapa I, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $2,5 \times 10^3$ células por poço e incubadas *overnight* para completa adesão. Após este período, o sobrenadante foi retirado e substituído por meio de cultura novo contendo ou não os respectivos tratamentos. As células foram mantidas nessas condições, sem troca de meio nos tempos de 24, 48 e 72 horas para posteriores análises.

Para os ensaios da Etapa II, as células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 células por poço e em placas de 12 poços na concentração de 10×10^4 células por poço, e incubadas *overnight* para total adesão das mesmas. Semelhante aos ensaios da etapa I, as células foram tratadas e mantidas nas mesmas condições de cultura pelos períodos de 1, 24, 48 e 72 horas, sem troca de meio.

3.3 Viabilidade celular pelo método de exclusão por *Trypan blue*

Para contagem e determinação da viabilidade celular antes dos ensaios, o método de exclusão por *Trypan blue* foi utilizado. Para isto, 10 μ L de suspensão celular foram adicionados a 10 μ L do corante azul de tripan (diluição 1:2), após homogeneização, 10 μ L desta solução foram colocados na câmara de Neubauer para quantificação das células vivas (não coradas) e mortas (coradas). Para a realização dos ensaios, culturas celulares com viabilidade acima de 90% foram utilizadas.

3.4 Atividade metabólica por ensaio de MTT (tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

Para avaliar a atividade metabólica celular foi realizado o ensaio de MTT. Para isto, células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de $2,5 \times 10^3$ células por poço e mantidas em cultura com os respectivos tratamentos por 24, 48 e 72 horas. Três horas antes de completar os respectivos períodos de incubação (21, 45 e 69 horas após tratamentos, respectivamente) os sobrenadantes foram substituídos por 100 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL), para incubação ao abrigo da luz nas mesmas condições de cultura. Após este período a solução de MTT foi retirada e 100 μ L de DMSO foram adicionados para incubação ao abrigo

da luz, em estufa à 37°C por 10 minutos, ao término do período de incubação, placas contendo as células foram então retiradas da estufa e imediatamente lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550nm.

3.5 Ensaio de Viabilidade por Cristal Violeta

A viabilidade celular após cada tratamento foi verificada pelo ensaio colorimétrico com cristal violeta. Para isto, células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de $2,5 \times 10^3$ células por poço. Após 24, 48 e 72 horas dos respectivos tratamentos, sobrenadantes foram descartados e os poços com células aderidas foram lavados duas vezes com 150 μ L de tampão fosfato-salino (PBS de *phosphate buffered saline*) 1X. Em seguida foram adicionados 100 μ L de solução contendo etanol com ácido acético na proporção 3:1 sendo mantido em incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, esta solução foi substituída por 100 μ L de Cristal Violeta 0,1% para incubação ao abrigo da luz, à temperatura ambiente por mais 10 minutos. Logo, o corante foi descartado e os poços foram lavados duas vezes com 150 μ L de água destilada. Em seguida, 100 μ L de ácido acético 10% foram adicionados e as placas contendo as células foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz e em movimento constante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 550nm.

3.6 Análises de apoptose e necrose por citometria de fluxo (Anexina – 7AAD)

Para a determinação do tipo de morte celular que são capazes de induzir os tratamentos utilizados, as células B16F10 foram cultivadas em placas de 24 poços e mantidas com os respectivos tratamentos por 1, 24, 48 ou 72 horas. Células presentes tanto no sobrenadante como na fração aderente foram coletadas. As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 100 μ L de tampão Anexina contendo 1 μ L de PE Annexin V (PE) e 1 μ L de 7-Amino-Actinomycin (7AAD) contidos em kit específico (BD Biosciences, San Diego – CA, USA). Passados 15 minutos de incubação à temperatura ambiente e protegidas da luz, 100 μ L de tampão Anexina foram adicionados para aquisição de amostras no citômetro AccuriTMC6 (BD Biosciences) seguindo o *template* recomendado pelo fabricante com variações, ao padronizar a

coleta pelo número de eventos e não pelo tempo. Assim, considerando o *Gate P1* (células totais) foram adquiridos 10.000 eventos para as análises de 1 hora e até 20.000 eventos para as análises de 24, 48 e 72 horas. Para as análises dos dados adquiridos, o *software* do mesmo equipamento foi utilizado.

3.7 Avaliação de espécies reativas de oxigênio por sonda DCFH-DA

A fim de verificar a capacidade de liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células após cada tratamento, foi utilizada a sonda não fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Esta sonda atravessa facilmente a membrana celular e sofre desacetilação devido a enzimas intracelulares. A DCFH quando em contato com EROs, transforma-se em diclorofluoresceína (DCF), que é altamente fluorescente. Com isto quanto maior a fluorescência emitida, maior a presença de compostos oxidantes.

Para este ensaio, células foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 células por poço, e após adesão *overnight*, foram tratadas com os respectivos tratamentos. Após 1 hora de incubação com os tratamentos, sobrenadantes foram retirados e substituídos por meio RPMI acrescido de 10 μ L da sonda DCFH-DA 0,1 mM. Células foram novamente submetidas às mesmas condições de cultura por um período de 1 hora. Após este período, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes foram coletadas e lavadas 1x com PBS 1X. Células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS para aquisição e análises no citômetro Accuri™C6 (BD), usando o canal FL1 (Fic) e total de 10.000 eventos da população (*Gate*) correspondente às células viáveis.

3.8 Avaliação de citocinas pela técnica de CBA (*Cytometric Bead Array*)

Os sobrenadantes das culturas tratadas ou não foram coletados para a determinação de citocinas inflamatórias (IL-12p70, TNF, IFN- γ , MCP-1, IL-10, IL-6), utilizando o *kit* BD *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation* (BD-Biosciences). Para isto, 20 μ L de cada amostra (tanto da curva padrão, quanto das amostras a serem analisadas) foram incubadas com 20 μ L de uma mistura de *beads* de captura e anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo *phycoerythrin* (PE). As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente no escuro

e após lavagem, adquiridas no citômetro FACS Accuri™C6, conforme *template* disponibilizado (BD Bioscience). Total de 1800 eventos foram adquiridos e a análise dos dados foi realizada utilizando o software de análises para CBA (*FCAP Array software* – BD Biosciences).

3.9 Morfologia celular por coloração de Giemsa

Para avaliação da morfologia celular após cada tratamento, células B16F10 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas. Após 1, 24 ou 48 horas dos tratamentos, os sobrenadantes foram coletados para análises e as lamínulas contendo as células foram fixadas por 5 minutos com metanol absoluto. Em seguida, o corante Giemsa (Laborclin, Paraná, Brasil), diluído 1:10 em água foi acrescentado e mantido por 10 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada e secas ao ar, as lamínulas foram montadas em lâminas contendo uma gota de *entellam*® (MercK) para análises no microscópio ótico Nikon eclipse E200 (Nikon Inc. USA). As análises foram avaliadas também por patologista externo sendo desta maneira realizadas em duplo cego.

3.10 Ensaio de migração celular – *Wound Healing*

O ensaio de migração celular *Wound Healing* foi realizado para avaliar a influência dos tratamentos homeopáticos de *Viscum album* na migração das células B16F10. Para isso, células foram cultivadas em placas de 12 poços e após adesão *overnight* foram tratadas ou não com as potências de *Viscum album*, após 1 hora de tratamento com incubação nas mesmas condições de cultura, foi realizada uma linha constante ("ferida") em cada poço, com ajuda de uma ponteira de 1000 µL pressionando-a delicadamente contra o assoalho do poço da placa, provocando a descontinuidade da monocamada celular. Imediatamente, as células não aderidas foram retiradas por lavagem sucessivas com RPMI (5 vezes) e em seguida 1 mL de meio completo novo foi acrescido para manter as células em incubação nas mesmas condições de cultura por até 24 horas. Cada poço com fenda foi fotografado nos intervalos de tempo de 1, 4, 18 e 24 horas a fim de determinar o crescimento das células tumorais na "ferida" como

indicativo de migração. As imagens foram avaliadas com o auxílio do programa de análises de imagem (ImageJ) para determinar a distância entre as duas margens da fenda.

3.11 Análise estatística

Os testes de Normalidade (*Shapiro-Wilk*) e Homogeneidade (*Levene*) foram aplicados para verificar se as distribuições das amostras foram ou não paramétricas. Em seguida, o teste de análises de variâncias (ANOVA) de duas vias com o pós-teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Análises e gráficos foram realizados usando *GraphPad Prism 8 Software* (GraphPad Prism, California, USA) e o suplemento para *Excell – Real Stats*. Diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas com $\alpha = 0,05$.

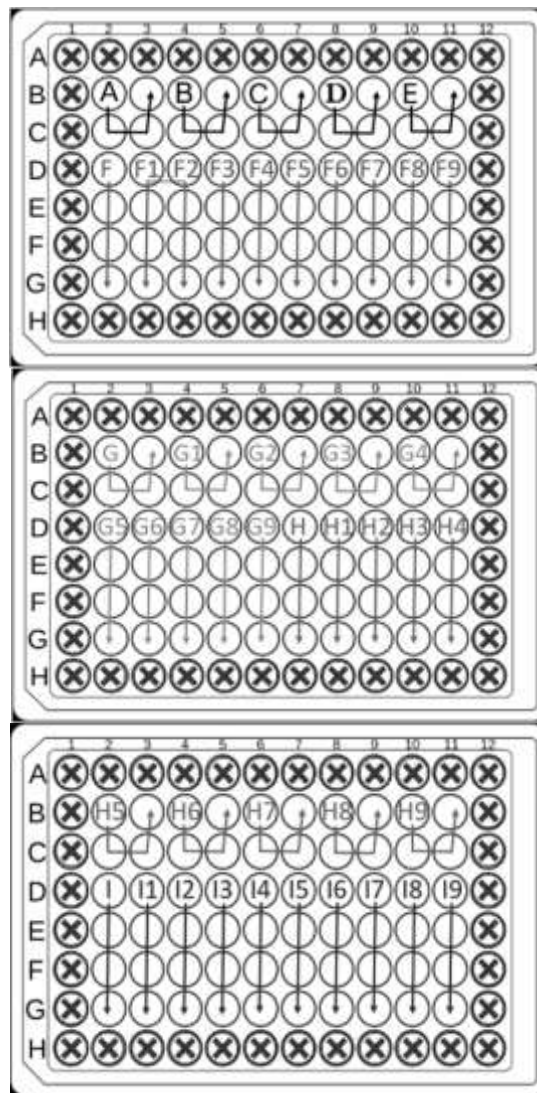
3.12 Delineamento experimental

3.12.1 Etapa I. Seleção de ultradiluições de VA com potencial efeito citotóxico sobre células tumorais.

Análises de viabilidade e atividade metabólica celular foram realizadas usando os ensaios de Cristal Violeta e MTT, respectivamente. Nesses testes, as células de melanoma murino B16F10 foram tratadas com 4 tipos de tintura mãe (TM): TM de VA de *Abies alba* de verão (V.Av); TM de VA de *Abies alba* de inverno (V.Ai.); TM de VA de *Quercus robur* de verão (V.Qv.) e TM de VA de *Quercus robur* de inverno (V.Qi.) e com suas respectivas ultradiluições em três escalas de potência, sendo: decimal (DH): 3DH, 12DH e 30DH; centesimal (CH): 6CH, 12CH e 200CH e cinquenta milésimal (LM): 2LM, 3LM e 5LM; além dos controles (álcool 0,3%; álcool 0,3% dinamizado; H₂O miliQ dinamizada e Carboplatina 10%), totalizando 45 grupos, cada um em quadruplicata. Os controles não foram cegados e ficaram indicados com letras de A até E, sendo: A = B16F10 sem tratamento; B = álcool 0,3%; C = álcool 0,3% dinamizado; D = H₂O ultrapura dinamizada; E = carboplatina 10%. Já os tratamentos homeopáticos foram cegados por colaboradores não pertencentes ao grupo de

pesquisa, de forma que uma letra, de F até I, corresponderia a alguma das TMs e suas respectivas diluições foram rotuladas com letras e números de 1 a 9 (ex. F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9). Na placa de cultivo, os poços laterais não foram utilizados para evitar erros na leitura de absorbância inerentes à localização dos mesmos, sendo demarcados com “X” (Figura 1).

Figura 1: Disposição dos grupos nas placas de 96 poços para realização dos testes em quadruplicatas.



Fonte: própria.

As condições foram avaliadas nos tempos de 24, 48, e 72 horas. Para isto, as células de melanoma B16F10 foram plaqueadas na concentração de $2,5 \times 10^3$ células por poço, essa concentração foi selecionada após padronização prévia. Com as análises dos resultados, foram selecionadas para os ensaios a serem realizados na Etapa II as TMs e seus medicamentos, um

de cada escala de diluição, que apresentaram a melhor resposta quando comparadas às células não tratadas e com resposta semelhante ou melhor que o quimioterápico de uso convencional, Carboplatina (Figura 2).

3.12.2 Etapa II. Avaliação dos mecanismos de ação das ultradiluições de VA com potencial citotóxico sobre células tumorais.

TMs e ultradiluições de VA que demonstraram potencial efeito citotóxico na Etapa I, sendo: TM VA *Abies* verão e TM VA *Quercus* verão, e suas diluições: 12DH, 200CH e 5LM, foram utilizadas novamente na realização de ensaios adicionais para investigar os possíveis mecanismos de ação destes medicamentos. Considerando que a indução de morte por apoptose, ao invés de necrose, em medicamentos quimioterápicos é uma alternativa em geral favorável para melhor eliminação das células tumorais, foram investigados os percentuais de morte por apoptose e por necrose após o tratamento das células tumorais com essas medicações, além da verificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Adicionalmente, com o intuito de compreender melhor o tipo de resposta imune desencadeada pelas homeopáticas foi avaliada a produção de citocinas inflamatórias após cada tratamento, além da verificação da morfologia destas células para compreender os possíveis efeitos dos tratamentos sobre as células B16F10.

Em paralelo, uma vez que a capacidade de formar tumores secundários é o padrão característico de células de melanoma altamente agressivas, foram realizadas análises de migração celular. Assim, dados obtidos nestes ensaios poderão dar informações relevantes e inéditas dos efeitos destes medicamentos sobre a capacidade metastática de células de melanoma murino.

Semelhante à Etapa I, todos os ensaios foram realizados sempre na presença dos controles, sendo de igual modo: A = B16F10 sem tratamento; B = álcool 0,3%; C = álcool 0,3% dinamizado; D = H₂O miliQ dinamizada; E = carboplatina 10%. Os tratamentos selecionados para esta fase foram novamente cegados por colaboradores alheios à pesquisa e mantendo os mesmos parâmetros da fase anterior, ou seja, uma letra sozinha para TM (sendo F ou G) e uma letra seguida de número para as respectivas diluições (sendo F1, F2, F3 ou G1, G2, G3) (Figura 3).

Figura 2: Fluxograma do Delineamento Experimental com detalhamento dos ensaios realizados na Fase I.

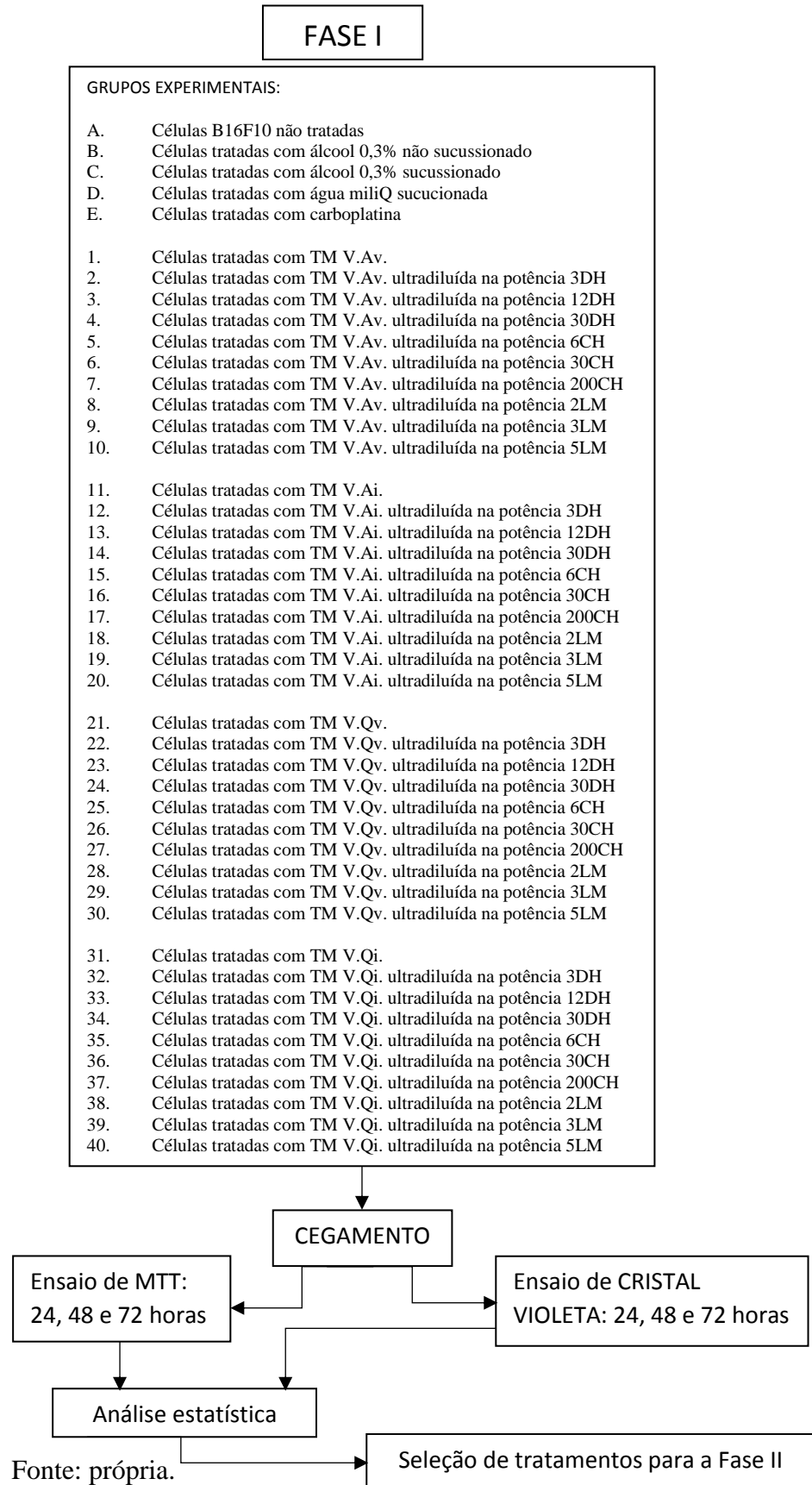
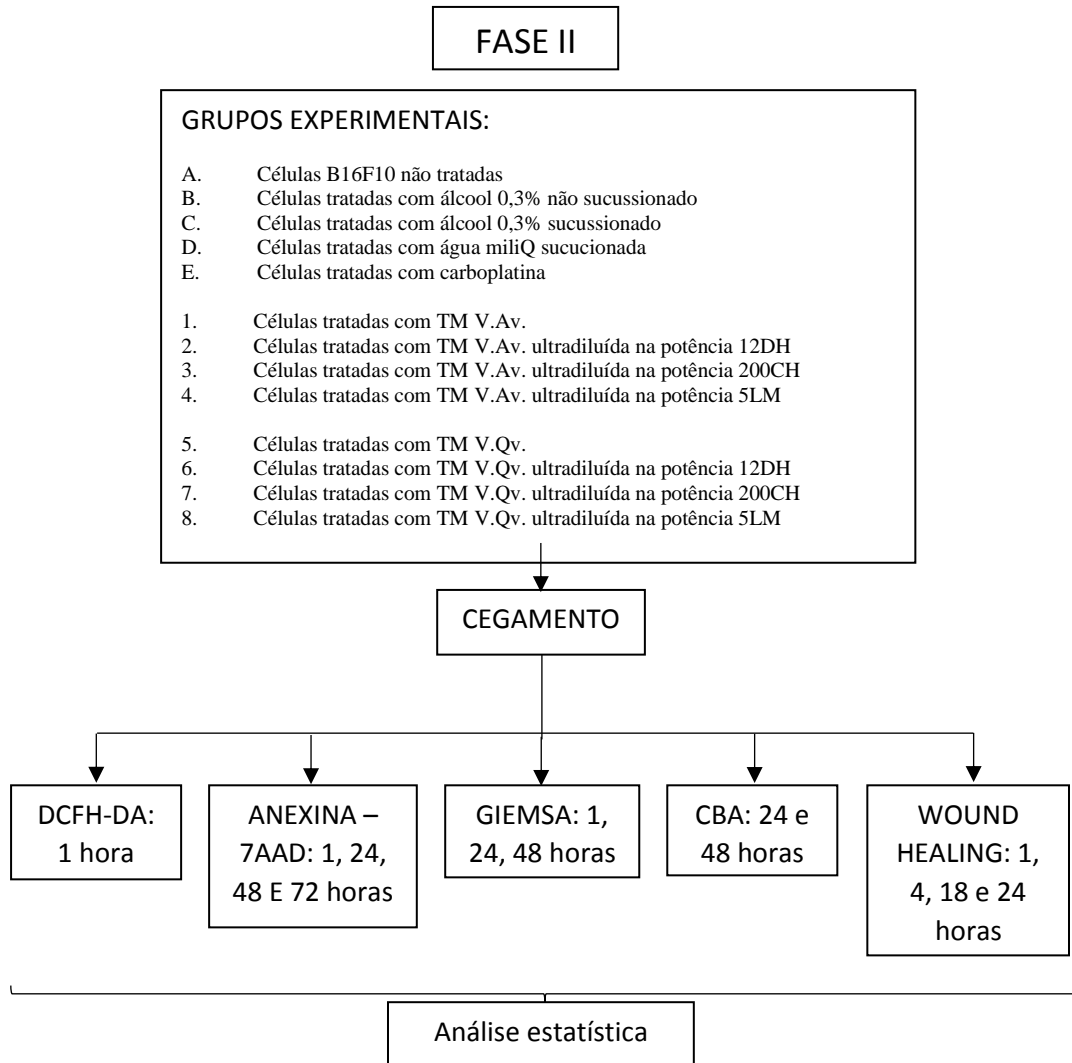


Figura 3: Fluxograma do Delineamento Experimental com detalhamento dos ensaios realizados na Fase II.



Fonte: própria.

4 RESULTADOS

4.1 Análises da atividade metabólica das células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de *Viscum album* pelo ensaio de MTT (tetrazolium salt3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

Conforme observado no Gráfico 1, no ensaio de MTT todas as tinturas mães (TM) testadas não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle positivo (Carboplatina), em nenhum dos tempos avaliados. No entanto, apresentaram diferenças quando comparadas ao controle negativo (células sem tratamento) onde, no tempo de 24 horas, as absorvâncias nos grupos de células tratadas com as tinturas mãe foram significativamente menores: VA de *Abies alba* de verão (V.Av) 46% menor ($p < 0,001$), VA de *Quercus robur* de inverno (V.Qi) 42% menor ($p < 0,001$), VA de *Abies alba* de inverno (V.Ai) 46% menor ($p < 0,001$) e VA de *Quercus robur* de verão (V.Qv) 45% menor ($p < 0,001$). Essa diferença percentual aumentou ao longo do tempo, sendo que no tempo de 48 horas as absorvâncias foram também menores nas células tratadas com as tinturas mães: V.Av 78% menor ($p < 0,001$), V.Qi 77% menor ($p < 0,001$), V.Ai 78% menor ($p < 0,001$) e em V.Qv 78% menor ($p < 0,001$). No tempo de 72 horas houve ainda pequeno aumento deste percentual em relação ao controle negativo, sendo que em células tratadas com a tintura mãe de V.Av a absorvância foi 80% menor ($p < 0,001$), em V.Qi foi 81% menor ($p < 0,001$), em V.Ai foi 82% menor ($p < 0,001$) e, em V.Qv foi 82% menor ($p < 0,001$).

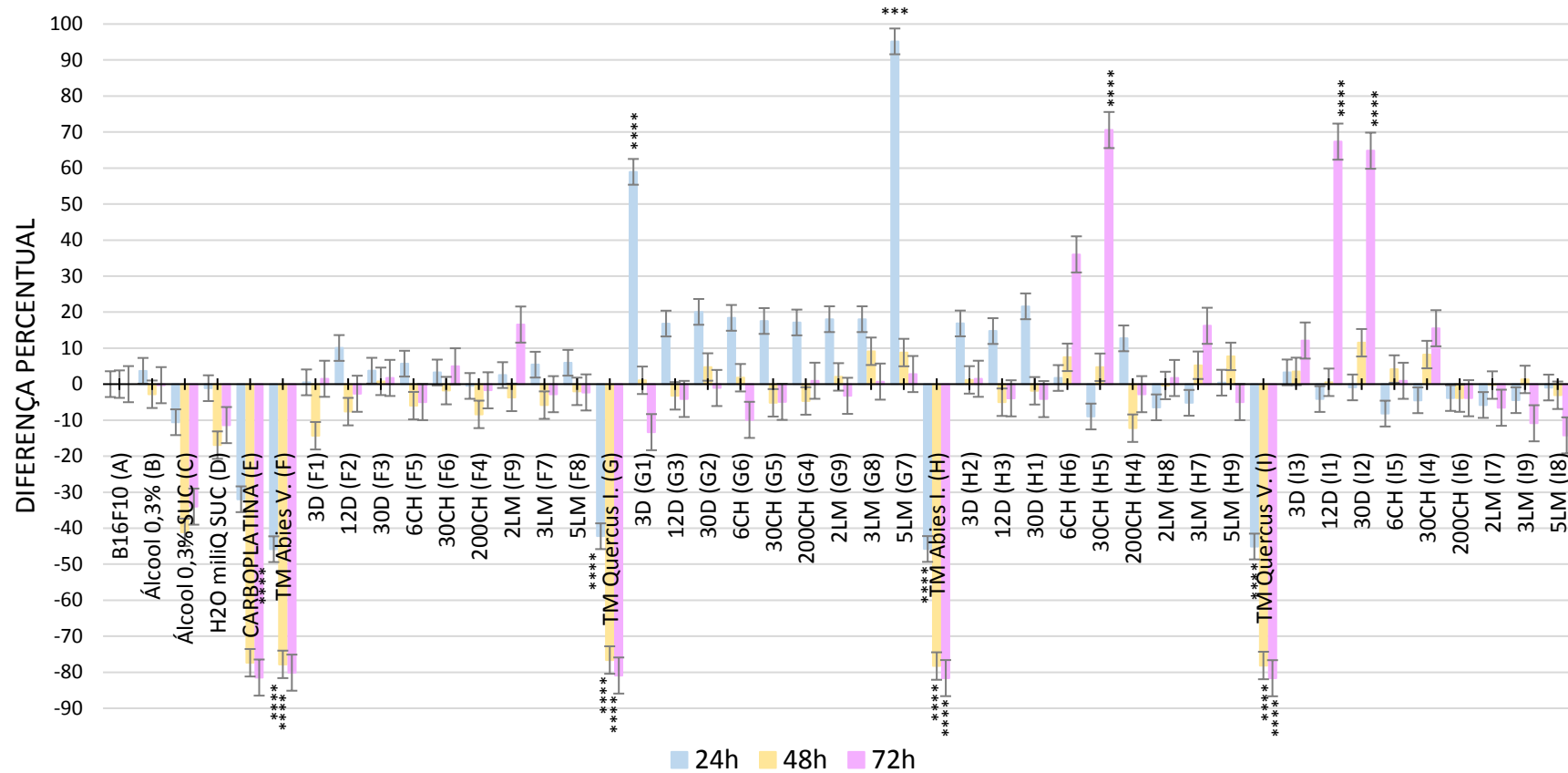
Com relação às potências homeopáticas, quando os grupos tratados foram comparados com a carboplatina, houve diferença significativa em todas as dinamizações (Tabela 1). Entretanto, quando comparadas com o controle negativo não houve diferença significativa, salvo em alguns casos, como às 24 horas no grupo tratado com V.Qi 3DH onde a absorvância registrada foi 59% maior ($p < 0,001$) e no grupo V.Qi 5LM, onde o aumento foi de 95% ($p < 0,001$). Estas diferenças não se mantiveram ao longo do tempo, sendo que com 48 horas nenhuma das potências homeopáticas demonstrou diferenças significativas, para mais ou para menos, quando comparadas ao controle negativo no ensaio de MTT (Figura 4). Contudo, as análises de 72 horas demonstraram aumento significativo no percentual dos grupos V.Ai 30CH (71%; $p < 0,001$), V.Qv 12DH (67%; $p < 0,001$) e V.Qv 30DH (65%; $p < 0,001$).

Tabela 1: Dados estatísticos obtidos no ensaio MTT.

Código Cego - Tratamento	Sem tratamento		
	24h	48h	72h
F – <i>Abies a.</i> verão	**** (-46)	**** (-78)	**** (-80)
F1 – 3DH	ns	ns	ns
F2 – 12DH	ns	ns	ns
F3 – 30DH	ns	ns	ns
F4 – 200CH	ns	ns	ns
F5 – 6CH	ns	ns	ns
F6 – 30CH	ns	ns	ns
F7 – 3LM	ns	ns	ns
F8 – 5LM	ns	ns	ns
F9 – 2LM	ns	ns	ns
G – <i>Quercus r.</i> inverno	**** (-42)	**** (-77)	**** (-81)
G1 – 3DH	**** (+59)	ns	ns
G2 – 30DH	ns	ns	ns
G3 – 12DH	ns	ns	ns
G4 – 200CH	ns	ns	ns
G5 – 30CH	ns	ns	ns
G6 – 6CH	ns	ns	ns
G7 – 5LM	**** (+95)	ns	ns
G8 – 3LM	ns	ns	ns
G9 – 2LM	ns	ns	ns
H – <i>Abies a.</i> inverno	**** (-46)	**** (-78)	**** (-82)
H1 – 30DH	ns	ns	ns
H2 – 3DH	ns	ns	ns
H3 – 12DH	ns	ns	ns
H4 – 200CH	ns	ns	ns
H5 – 30CH	ns	ns	**** (+71)
H6 – 6CH	ns	ns	ns
H7 – 3LM	ns	ns	ns
H8 – 2LM	ns	ns	ns
H9 – 5LM	ns	ns	ns
I – <i>Quercus r.</i> verão	**** (-45)	**** (-78)	**** (-82)
I1 – 12DH	ns	ns	**** (+67)
I2 – 30DH	ns	ns	**** (+65)
I3 – 3DH	ns	ns	ns
I4 – 30CH	ns	ns	ns
I5 – 6CH	ns	ns	ns
I6 – 200CH	ns	ns	ns
I7 – 2LM	ns	ns	ns
I8 – 5LM	ns	ns	ns
I9 – 3LM	ns	ns	ns

Significância estatística (asteriscos) e diferença percentual (- menor percentual, + maior percentual) das médias de absorvâncias dos grupos tratados em relação ao grupo controle negativo (não tratado), ao longo dos tempos de 24, 48 e 72 horas, no ensaio de MTT com a linhagem celular B16F10. * = $p < 0,5$; ** = $p < 0,1$; *** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,001$; ns = não significativo. Fonte: própria.

Figura 4: Análises de atividade metabólica das células B16F10 após tratamentos com ultradiluições de *Viscum album*.



Representação gráfica da diferença percentual, em relação ao grupo não tratado, dos dados obtidos no ensaio MTT com as células de melanoma B16F10 tratadas com: veículos (água dinamizada, álcool 0,3% ou álcool 0,3% dinamizado), com o quimioterápico carboplatina (controle positivo) com as tinturas mães de *Viscum album* coletado das árvores *Quercus robur* e *Abies alba* no verão (V.Qv. ou V.Av) ou no inverno (V.Qi. ou V.Ai.) ou com suas respectivas preparações ultradiluídas nas escalas decimal (3DH, 12DH e 30DH), centesimal (6CH, 30CH, 200CH) ou cinquenta milesimal (2LM, 3LM, 5LM), quando comparadas com as células B16F10 não tratadas (controle negativo), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Colunas representam a média percentual em cada grupo com seus respectivos erros padrão. * indica $p < 0,05$, ** = $p < 0,1$; *** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,001$. Fonte: própria.

4.2 Análises de viabilidade das células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de *Viscum album* (Ensaio de cristal violeta).

Dados obtidos nas análises de viabilidade pelo ensaio de Cristal Violeta, revelaram que células B16F10 tratadas com as diferentes TMs de VA não apresentam diferenças significativas quando comparadas ao controle positivo (Carboplatina); salvo no período de 24 horas, onde a absorbância obtida nos tratamentos com as TMs V.Av., V.Ai. e V.Qv. foram: 11, 12 e 30% menores, respectivamente. Em paralelo, análises dos tratamentos com as TMs quando comparadas às células B16F10 não tratadas apresentaram resultados significativamente menores em todos os tempos, cujos percentuais às 24 horas foram: V.Av. 33%, V.Ai. 34%, V.Qv. 46% e V. Qi 31%. Com 48 horas esses valores oscilaram, sendo que a diferença percentual das TMs de V.Av e V.Ai. foi 38% menor. Já no caso da TM de V.Qi. foi 35% menor e a TM de V.Qv. 40% menor. Às 72 horas essas diferenças foram ainda maiores, sendo: TM V.Av 50%, V.Ai. 44%, TM V.Qv. 45% e V.Qi. 39% (Tabela 2).

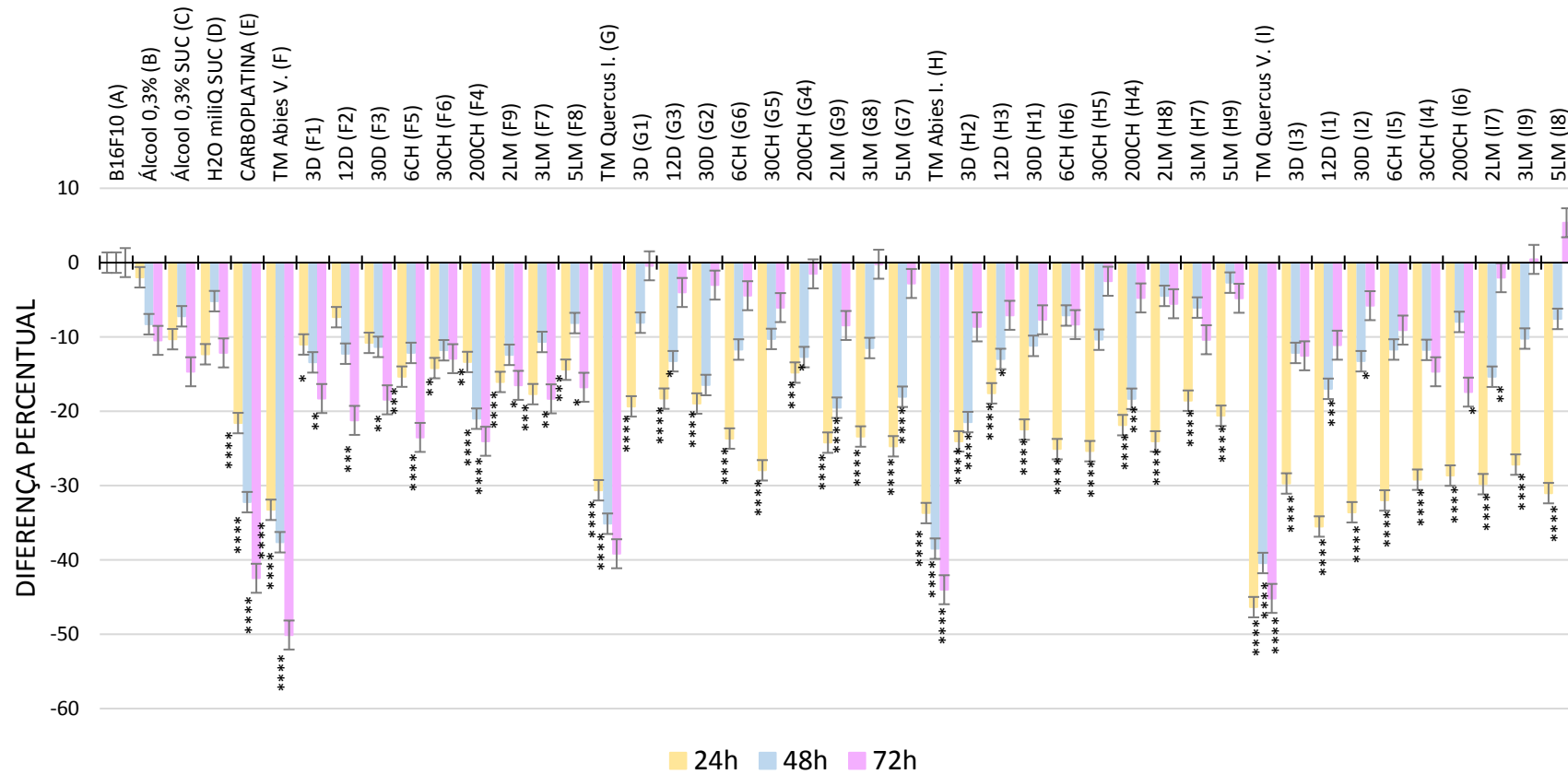
Em contraste, as potências homeopáticas apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle positivo de forma progressiva ao longo do tempo. Quando comparadas com as células sem tratamento, as potências homeopáticas com 24 horas apresentaram diferenças significativas para menos em sua maioria, no entanto essa diferença oscilou ao longo do tempo, de forma que nos grupos V.Av 6CH; 2LM; 3LM e 5LM e no grupo V.Qv. 200CH não houve diferença às 48 horas e às 72 horas voltou a apresentar; nos grupos V.Qi. 12DH, 30DH, 200CH, 2LM e 5LM; assim como V.Ai. 3DH, 12DH, 200CH e V.Qv. 12DH, 30DH e 2LM as diferenças diminuíram ao longo do tempo, deixando de apresentar com 72 horas; os grupos V.Av 3DH, 12DH, 30DH e 200CH apresentaram aumento da diferença ao longo do tempo e os demais grupos passaram a não expressar diferenças significativas após 24 horas (Gráfico 2).

Tabela 2: Dados estatísticos obtidos no ensaio Cristal Violeta

Código Cego - Tratamento	Sem tratamento		
	24h	48h	72h
F – <i>Abies a.</i> verão	**** (-33)	**** (-38)	**** (-50)
F1 – 3DH	ns	* (-13)	** (-18)
F2 – 12DH	ns	ns	*** (-21)
F3 – 30DH	ns	ns	** (-18)
F4 – 200CH	** (-13)	**** (-21)	**** (-24)
F5 – 6CH	*** (-15)	ns	**** (-24)
F6 – 30CH	** (-14)	ns	ns
F7 – 3LM	**** (-18)	ns	** (-18)
F8 – 5LM	*** (-14)	ns	* (-17)
F9 – 2LM	**** (-16)	ns	* (-17)
G – <i>Quercus r.</i> inverno	**** (-31)	**** (-35)	**** (-39)
G1 – 3DH	**** (-19)	ns	ns
G2 – 30DH	**** (-19)	*** (-16)	ns
G3 – 12DH	**** (-18)	* (-13)	ns
G4 – 200CH	*** (-15)	* (-13)	ns
G5 – 30CH	**** (-28)	ns	ns
G6 – 6CH	**** (-24)	ns	ns
G7 – 5LM	**** (-25)	**** (-18)	ns
G8 – 3LM	**** (-23)	ns	ns
G9 – 2LM	**** (-24)	**** (-20)	ns
H – <i>Abies a.</i> inverno	**** (-34)	**** (-38)	**** (-44)
H1 – 30DH	**** (-22)	ns	ns
H2 – 3DH	**** (-24)	**** (-21)	ns
H3 – 12DH	**** (-18)	* (-13)	ns
H4 – 200CH	**** (-22)	*** (-18)	ns
H5 – 30CH	**** (-25)	ns	ns
H6 – 6CH	**** (-25)	ns	ns
H7 – 3LM	**** (-19)	ns	ns
H8 – 2LM	**** (-24)	ns	ns
H9 – 5LM	**** (-21)	ns	ns
I – <i>Quercus r.</i> verão	**** (-46)	**** (-40)	**** (-45)
I1 – 12DH	**** (-36)	*** (-17)	ns
I2 – 30DH	**** (-34)	* (-13)	ns
I3 – 3DH	**** (-30)	ns	ns
I4 – 30CH	**** (-29)	ns	ns
I5 – 6CH	**** (-32)	ns	ns
I6 – 200CH	**** (-29)	ns	* (-17)
I7 – 2LM	**** (-30)	** (-15)	ns
I8 – 5LM	**** (-31)	ns	ns
I9 – 3LM	**** (-27)	ns	ns

Significância estatística (asteriscos) e diferença percentual (- menor percentual, + maior percentual) das médias de absorvâncias dos grupos tratados em relação ao grupo controle negativo (não tratado), ao longo dos tempos de 24, 48 e 72 horas, no ensaio de Cristal Violeta com a linhagem celular B16F10. * = $p < 0,5$; ** = $p < 0,1$; *** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,001$; ns = não significativo. Fonte: própria.

Figura 5: Análises de viabilidade das células B16F10 após tratamentos com ultradiluições de *Viscum album*.



Representação gráfica da diferença percentual, em relação ao grupo não tratado, dos dados obtidos no ensaio cristal violeta das células de melanoma B16F10 tratadas com: os veículos (água dinamizada, álcool 0,3% ou álcool 0,3% dinamizado), com o quimioterápico carboplatina (controle positivo) com as tinturas mães de *Viscum album* coletado das árvores *Quercus robur* e *Abies alba* no verão (V.Qv. ou V.Av) ou no inverno (V.Qi. ou V.Ai.) ou com suas respectivas preparações ultradiluídas nas escalas decimal (3DH, 12DH e 30DH), centesimal (6CH, 30CH, 200CH) ou cinquenta milesimal (2LM, 3LM, 5LM), quando comparadas com as células B16F10 não tratadas (controle negativo), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Colunas representam a média dos percentuais em cada grupo com seus respectivos erros padrão. * indica $p < 0,05$, ** = $p < 0,1$; *** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,001$.

4.3 Análises de apoptose e necrose em células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de *Viscum album* (Anexina – 7AAD).

4.3.1 Viabilidade Celular

Na análise de viabilidade celular (Figuras 4, 5 e 6A) após uma hora de tratamento, quando comparado com o grupo não tratado (média=54,32%), houve menor percentual de células viáveis no grupo tratado com TM V.Av. (média=25,64%; $p<0,05$), e maior percentual de células viáveis nos grupos V.Qv. 5LM (média=70,52%, $p<0,01$) e V.Qv. 12DH (média=70,54%, $p<0,01$). Não houve diferença significativa nos grupos tratados com os veículos (álcool 0,3%: média=42,06% , $p=0,804$; álcool 0,3% sucussionado: média=55,79% , $p=0,889$; água sucucionada: média= 60,17%, $p=0,915$) ou tratados com carboplatina (média=65,73% , $p=0,177$) bem como os grupos tratados com V.Av. 200CH (média=59,28%, $p<$), V.Av. 12DH (média=46,90%, $p=0,478$), V.Av. 5LM (média=53,09%, $p>0,999$), TM V.Qv. (média=27,04%, $p=0,132$) e V.Qv. 200CH (média=52,70%, $p>0,999$).

Após 24 horas, quando comparado com o grupo não tratado (média=33,24%), houve menor percentual de células viáveis no grupo V.Qv. (média=7,49%, $p<0,05$), e maior percentual de células viáveis nos grupos Álcool 0,3% Suc. (média=58,35%, $p<0,05$), V.Av. 5LM (média=68,76%, $p<0,01$), V.Qv. 200CH (média=68,44%, $p<0,01$), V.Qv. 5LM (média=61,83%, $p<0,01$) e V.Qv. 12DH (média=64,97%, $p<0,01$). Não houve diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=41,3%, $p=0,998$), Água Suc. (média=53,93%, $p=0,1613$), Carboplatina (média=16,32%, $p=0,0616$), TM V.Av. (média=12,32%, $p=0,319$), V.Av. 200CH (média=55,37%, $p=0,868$) e V.Av. 12DH (média=57,897, $p=0,079$).

Passadas 48 horas, quando comparados com o grupo sem tratamento (média=78,22%), houve menor percentual de células viáveis nos grupos Carboplatina (média=13,45%, $p<0,001$), TM V.Av. (média=3,38%, $p<0,01$), TM V.Qv. (média=8,93%, $p<0,001$) e V.Qv. 200CH (média=43,77%, $p<0,01$). Não houve diferença significativa em relação ao grupo sem tratamento nos grupos Álcool 0,3% (média=72,09%, $p=0,970$), Álcool 0,3% Suc. (média=75,09%, $p=0,999$), Água Suc. (média=74,11%, $p=0,9979$), V.Av. 200CH (média=65,78%, $p=0,277$), V.Av. 12DH (média=69,20%, $p=0,567$), V.Av. 5LM

(média=71,69%, $p=0,773$), V.Qv. 5LM (média=71,00%, $p=0,863$) e V.Qv. 12DH (média=72,78%, $p=0,957$).

Com 72 horas, quando comparados ao grupo sem tratamento (média=27,82%), houve menor percentual de células viáveis nos grupos Carboplatina (média=13,56%, $p<0,01$) e TM V.Av. (média=1,76%, $p<0,001$) e maior percentual de células viáveis nos grupos Álcool 0,3% Suc. (média=35,32%, $p<0,5$), V.Av. 200CH (média=49,04%, $p<0,01$), V.Av. 12DH (média=41,02%, $p<0,05$), V.Av. 5LM (média=50,79%, $p<0,001$), V.Qv. 200CH (média=47,78%, $p<0,001$) e V.Qv. 5LM (média=45,82%, $p<0,01$). Não houve diferença estatística nos grupos Álcool 0,3% (média=32,92, $p=0,111$), Água Suc. (média=49,15%, $p=0,103$), TM V.Qv. (média=7,80%, $p=0,116$) e V.Qv. 12DH (média=45,66%, $p=0,087$).

4.3.2 Apoptose

No ensaio de apoptose (Figuras 4, 5 e 6B) após uma hora não houve diferença significativa nos grupos, sendo os resultados, quando comparados com o grupo não tratado (média=5,58%): Álcool 0,3% (média=6,67%, $p=0,995$), Álcool Suc. (média=5,28%, $p>0,999$), Água Suc. (média=8,85%, $p=0,998$), Carboplatina (média=3,66%, $p=0,770$), TM V.Av. (média=0,005%, $p=0,104$), V.Av. 200CH (média=4,68%, $p=0,999$), V.Av. 12DH (média=3,76%, $p=0,851$), V.Av. 5LM (média=4,42%, $p=0,994$), TM V.Qv. (média=0,03%, $p=0,106$), V.Qv. 200CH (média=4,34%, $p=0,995$), V.Qv. 5LM (média=3,60%, $p=0,755$) e V.Qv. 12DH (média=3,40%, $p=0,912$).

Após 24 horas de tratamento, quando comparados com o grupo não tratado (média=5,46%), houve maior percentual de células em apoptose no grupo Carboplatina (média=58,91%, $p<0,01$). Não houve diferença significativa nos demais grupos, Álcool 0,3% (média=5,85%, $p>0,999$), Álcool Suc. (média=3,45%, $p=0,609$), Água Suc. (média=6,22%, $p=0,999$), TM V.Av. (média=0,10%, $p=0,072$), V.Av. 200CH (média=5,54%, $p>0,999$), V.Av. 12DH (média=4,14%, $p=0,904$), V.Av. 5LM (média=4,14%, $p=0,898$), TM V.Qv. (média=0,06%, $p=0,072$), V.Qv. 200CH (média=3,68%, $p=0,755$), V.Qv. 5LM (média=3,60%, $p=0,685$) e V.Qv. 12DH (média=5,39, $p>0,999$).

Passadas 48 horas de tratamento, quando comparados com o grupo não tratado (média=0,05%), houve maior percentual de células em apoptose no grupo Carboplatina (média=10,52%, $p<0,05$). Não houve diferença significativa nos demais grupos, Álcool 0,3% (média=0,47%, $p=0,961$), Álcool Suc. (média=0,35%), $p=0,620$), Água Suc. (média=0,14%, $p=0,560$), TM V.Av. (média=0, $p=0,532$), V.Av. 200CH (média=1,99%, $p=0,055$), V.Av. 12DH (média=0,25%, $p=0,083$), V.Av. 5LM (média=0,22%, $p=0,525$), TM V.Qv. (média=0,03%, $p>0,999$), V.Qv. 200CH (média=1,18%, $p=0,180$), V.Qv. 5LM (média=0,49%, $p=0,055$) e V.Qv. 12DH (média=0,65, $p=0,215$).

Com 72 horas, quando comparados com o grupo não tratado (média=2,31%), houve menor percentual de células em apoptose nos grupos TM V.Av. (média=0, $p<0,05$), V.Av. 12DH (média=0,84%, $p<0,05$) e TM V.Qv. (média=0,06%, $p<0,05$). Não houve diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=2,11%, $p>0,999$), Álcool Suc. (média=2,24%, $p>0,999$), Água Suc. (média=1,90%, $p=0,989$), Carboplatina (média=14,66%, $p=0,126$), V.Av. 200CH (média=2,51%, $p>0,999$), V.Av. 5LM (média=1,27%, $p=0,236$), V.Qv. 200CH (média=2,58%, $p>0,999$), V.Qv. 5LM (média=1,36%, $p=0,597$), V.Qv. 12DH (média=3,56%, $p>0,999$).

4.3.3 Apoptose tardia/Necrose

No ensaio de apoptose tardia/necrose (Figuras 4, 5 e 6C) após uma hora, quando comparados com o grupo não tratado (média=15,18%), houve maior percentual de células nesta condição no grupo TM V.Av. (média=62,04%, $p<0,05$). Não houve diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=31,19%, $p=0,378$), Álcool Suc. (média=18,44%, $p=0,979$), Água Suc. (média=9,64%, $p=0,871$), Carboplatina (média=7,21%, $p=0,494$), V.Av. 200CH (média=10,42%, $p=0,921$), V.Av. 12DH (média=11,37%, $p=0,993$), V.Av. 5LM (média=12,43%, $p=0,998$), TM V.Qv. (média=59,31%, $p=0,080$), V.Qv. 200CH (média=9,6%, $p=0,867$), V.Qv. 5LM (média=7,84%, $p=0,585$) e V.Qv. 12DH (média=7,83%, $p=0,565$).

Após 24 horas, quando comparados com o grupo não tratado (média=15,81%), houve maior percentual de células nesta condição nos grupos Carboplatina (média=23,59%, $p<0,05$), TM V.Av. (média=74,80%, $p<0,01$), V.Av. 12DH (média=28,49%, $p<0,05$), TM V.Qv.

(média=83,56%, $p<0,001$), e menor percentual no grupo Álcool Suc. (média=8,56%, $p<0,05$).

Não houve diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=14,12%, $p>0,999$), Água Suc. (média=18,91%, $p>0,999$), V.Av. 200CH (média=29,89%, $p=0,957$), V.Av. 5LM (média=23,94%, $p=0,326$), V.Qv. 200CH (média=20,1%, $p=0,415$), V.Qv. 5LM (média=22,62%, $p=0,269$) e V.Qv. 12DH (média=21,33%, $p=0,051$).

Passadas 48 horas, quando comparados com o grupo não tratado (média=0,30%), houve maior percentual de células nesta condição nos grupos Carboplatina (média=73,49%, $p<0,01$), TM V.Av. (média=77,97%, $p<0,001$), V.Av. 200CH (média=6,28%, $p<0,05$), TM V.Qv. (média=75,37%, $p<0,01$) e V.Qv. 200CH (média=3,01%, $p<0,01$). Não houve diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=1,18%, $p=0,838$), Álcool Suc. (média=0,90%, $p=0,585$), Água Suc. (média=0,59%, $p=0,740$), V.Av. 12DH (média=0,38%, $p>0,999$), V.Av. 5LM (média=0,48%, $p=0,974$), V.Qv. 5LM (média=1,24%, $p=0,568$) e V.Qv. 12DH (média=2,15%, $p=0,246$).

Com 72 horas, quando comparados com o grupo não tratado (média=49,63%), houve maior percentual de células nesta condição nos grupos Carboplatina (média=70,16%, $p<0,05$), TM V.Av. (média=80,72%, $p<0,01$) e TM V.Qv. (média=74,28%, $p<0,01$), e menor percentual nos grupos V.Av. 200CH (média=19,45%, $p<0,01$), V.Av. 12DH (média=28,41%, $p<0,01$), V.Av. 5LM (média=19,43%, $p<0,01$), V.Qv. 200CH (média=22,02%, $p<0,01$) e V.Qv. 5LM (média=30,03%, $p<0,05$). Não houve diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=43,38%, $p=0,537$), Álcool Suc. (média=41,72%, $p=0,340$), Água Suc. (média=19,51%, $p=0,175$), e V.Qv. 12DH (média=34,39, $p=0,158$).

4.3.4 Necrose

No ensaio de necrose (Figuras 4, 5 e 6D) após uma hora, não houve diferença entre os grupos, quando comparados com o grupo não tratado (média=24,90%), sendo os resultados: Álcool 0,3% (média=20,08%, $p=0,990$), Álcool Suc. (média=20,09%, $p=0,974$), Água Suc. (média=21,34%, $p=0,998$), Carboplatina (média=23,4%, $p>0,999$), TM V.Av. (média=12,31%, $p=0,418$), V.Av. 200CH (média=25,61%, $p>0,999$), V.Av. 12DH (média=37,96%, $p=0,8017$), V.Av. 5LM (média=30,05%, $p=0,989$), TM V.Qv. (média=13,61%, $p=0,584$), V.Qv. 200CH

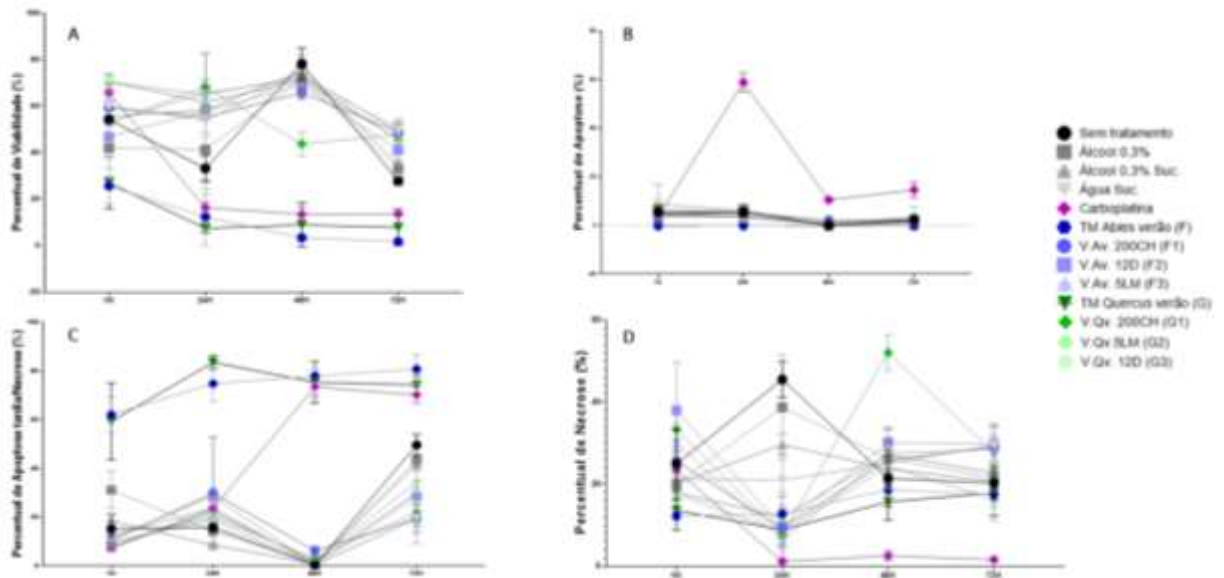
(média=33,36%, $p=0,852$), V.Qv. 5LM (média=17,63%, $p=0,869$) e V.Qv. 12DH (média=17,63%, $p=0,868$).

Após 24 horas, quando comparados com o grupo não tratado (média=45,50%), houve menor percentual de células em necrose nos grupos Álcool Suc. (média=29,66%, $p<0,05$), Carboplatina (média=1,18%, $p<0,01$), TM V.Av. (média=12,76%, $p<0,01$), V.Av. 200CH (média=9,21%, $p<0,01$), V.Av. 12DH (média=9,50%, $p<0,01$), V.Av. 5LM (média=6,18%, $p<0,01$), TM V.Qv. (média=8,88%, $p<0,01$), V.Qv. 200CH (média=7,79%, $p<0,001$), V.Qv. 5LM (média=11,95%, $p<0,01$) e V.Qv. 12DH (média=8,31%, $p<0,001$). Não houve diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=38,74%, $p=0,992$) e Água Suc. (média=20,94%, $p=0,084$).

Passadas 48 horas, quando comparados com o grupo não tratado (média=21,42%), houve maior percentual de células em necrose no grupo V.Qv. 200CH (média=52,04%, $p<0,05$). Não houve diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=26,27%, $p=0,997$), Álcool Suc. (média=23,68%, $p>0,999$), Água Suc. (média=25,18%, $p=0,999$), Carboplatina (média=2,55%, $p=0,099$), TM V.Av. (média=18,64%, $p=0,999$), V.Av. 200CH (média=25,96%, $p=0,982$), V.Av. 12DH (média=30,18%, $p=0,604$), V.Av. 5LM (média=27,61%, $p=0,814$), TM V.Qv. (média=15,67%, $p=0,935$), V.Qv. 5LM (média=27,27%, $p=0,964$) e V.Qv. 12DH (média=24,41%, $p=0,999$).

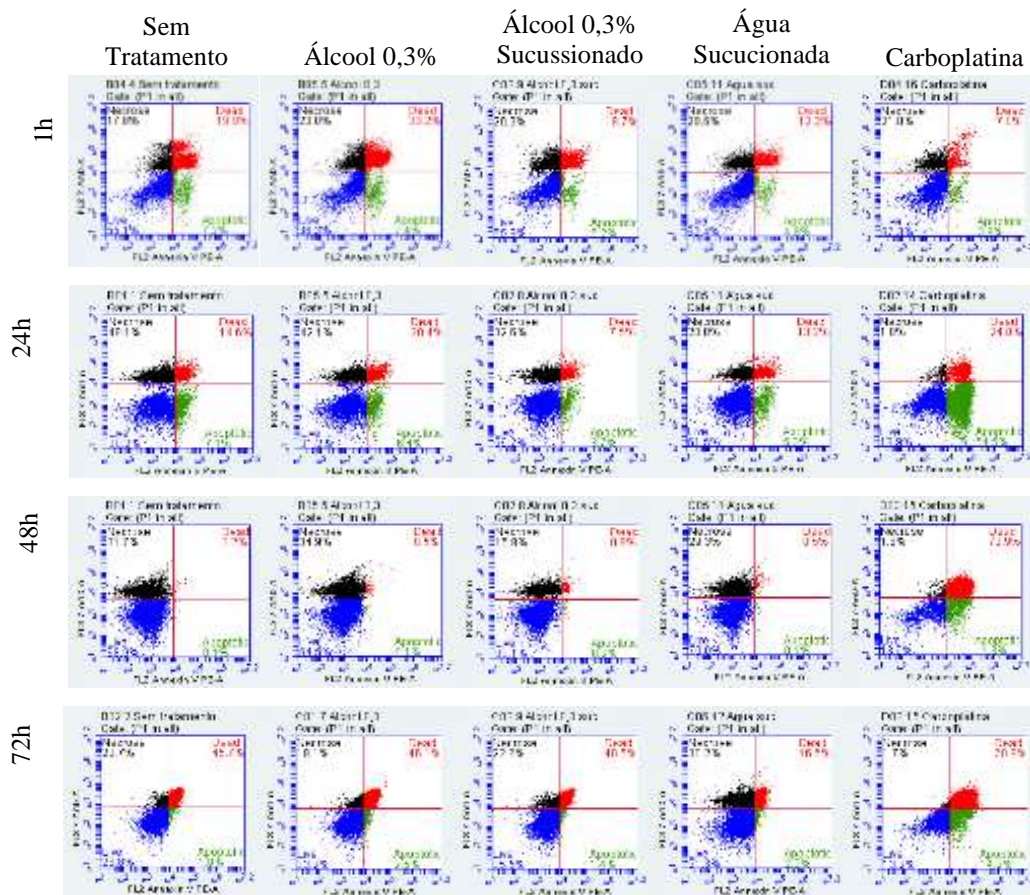
Com 72 horas, quando comparados com o grupo não tratado (média=20,25%), houve menor percentual de células em necrose no grupo Carboplatina (média=1,62%, $p<0,05$). Não houve diferença significativa nos grupos. Álcool 0,3% (média=21,7%, $p>0,999$), Álcool Suc. (média=20,74%, $p>0,999$), Água Suc. (média=29,45%, $p=0,548$), TM V.Av. (média=17,52%, $p=0,999$), V.Av. 200CH (média=29,01%, $p=0,425$), V.Av. 12DH (média=29,74%, $p=0,252$), V.Av. 5LM (média=28,56%, $p=0,238$), TM V.Qv. (média=17,86%, $p>0,999$), V.Qv. 200CH (média=27,62%, $p=0,533$), V.Qv. 5LM (média=22,80%, $p>0,999$) e V.Qv. 12DH (média=16,39%, $p=0,983$).

Figura 6: Representações gráficas dos percentuais de viabilidade e tipos de morte das células B16F10 após tratamentos.



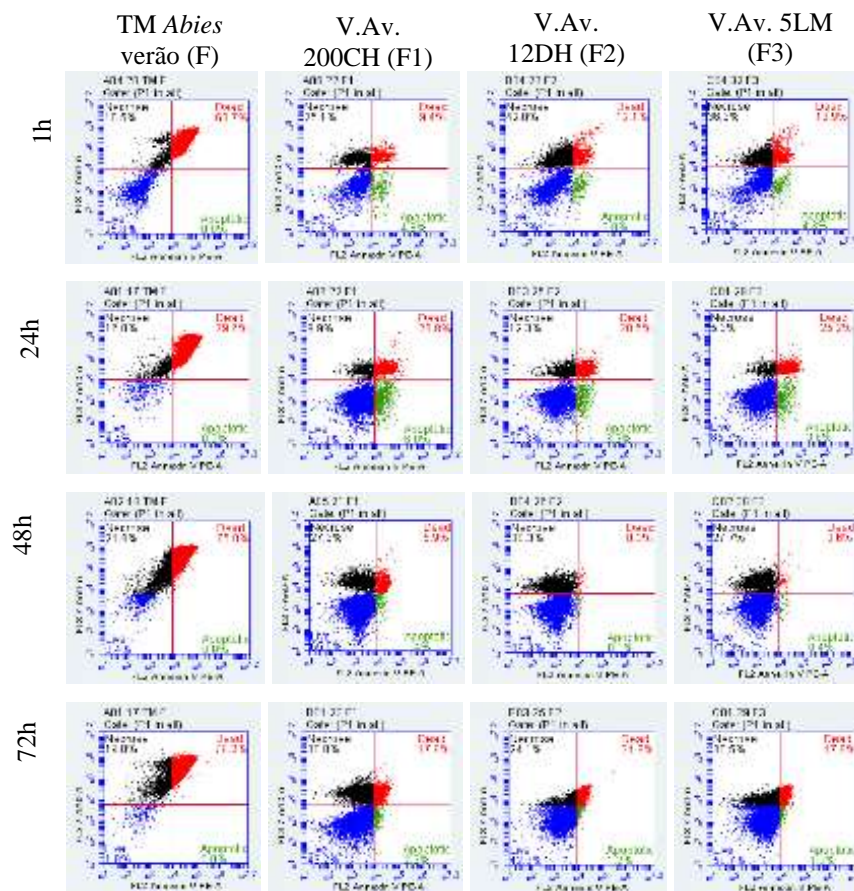
A – Representação gráfica do percentual de viabilidade das células B16F10 após 1, 24, 48 e 72 horas de tratamento. **B** – Representação gráfica do percentual de apoptose das células B16F10 após 1, 24, 48 e 72 horas de tratamento. **C** – Representação gráfica do percentual de apoptose tardia/necrose das células B16F10 após 1, 24, 48 e 72 horas de tratamento. **D** – Representação gráfica do percentual de necrose das células B16F10 após 1, 24, 48 e 72 horas de tratamento. Fonte: própria.

Figura 7: Percentual de células viáveis, em apoptose, apoptose tardia e necrose após tratamentos com os controles e sem tratamento.



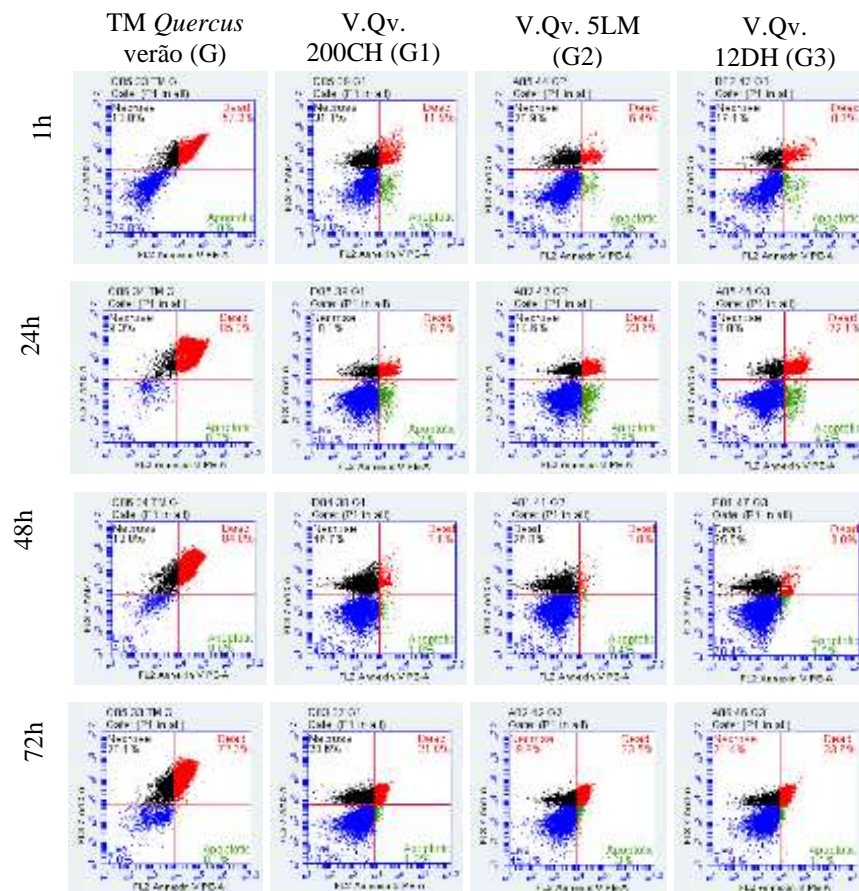
Dot-plots dos resultados obtidos nas análises de citometria de fluxo (Anexina – 7AAD) das células B16F10 não tratadas, tratadas com os veículos (Álcool 0,3%, Álcool 0,3% Sucussionado e Água Sucucionada) e tratadas com o quimioterápico Carboplatina, nos tempos de 1, 24, 48 e 72 horas de tratamento. Quadrantes representam as porcentagens de células viáveis (Anexina⁻ 7AAD⁻), em apoptose (Anexina⁺ 7AAD⁻), em necrose (Anexina⁻ 7AAD⁺) ou em apoptose tardia/necrose (Anexina⁺ 7AAD⁺). Fonte: própria.

Figura 8: Percentual de células viáveis, em apoptose, apoptose tardia e necrose após tratamentos com TM V.Av. e suas ultradiluições.



Dot-plots dos resultados obtidos nas análises de citometria de fluxo (Anexina – 7AAD) das células B16F10 tratadas com a tintura mãe de VA de *Abies alba* de verão (V.Av.) bem como suas ultradiluições homeopáticas 12DH, 200CH e 5LM, nos tempos de 1, 24, 48 e 72 horas de tratamento. Quadrantes representam as porcentagens de células viáveis (Anexina⁻ 7AAD⁻), em apoptose (Anexina⁺ 7AAD⁻), em necrose (Anexina⁻ 7AAD⁺) ou em apoptose tardia/necrose (Anexina⁺ 7AAD⁺). Fonte: própria.

Figura 9: Percentual de células viáveis, em apoptose, apoptose tardia e necrose após tratamentos com TM V.Qv. e suas ultradiluições.

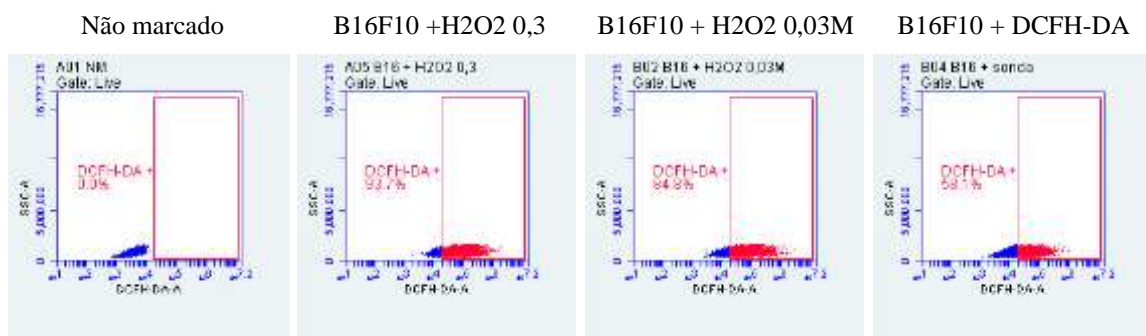


Dot-plots dos resultados obtidos nas análises de citometria de fluxo (Anexina – 7AAD) das células B16F10 tratadas com a tintura mãe de VA de *Quercus robur* de verão (TM V.Qv.) bem como suas ultradiluições homeopáticas 12DH, 200CH e 5LM, nos tempos de 1, 24, 48 e 72 horas de tratamento. Quadrantes representam as porcentagens de células viáveis (Anexina⁻ 7AAD⁻), em apoptose (Anexina⁺ 7AAD⁻), em necrose (Anexina⁻ 7AAD⁺) ou em apoptose tardia/necrose (Anexina⁺ 7AAD⁺). Fonte: própria.

4.4 Análises de produção de EROs por células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de *Viscum album* (Sonda DCFH-DA).

Para verificar o quadrante de positividade e os níveis basais de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células B16F10, medidos pela marcação da sonda fluorescente DCFH-DA no tempo de 1 hora, células foram tratadas ou não com H_2O_2 em duas concentrações diferentes 0,3 M e 0,03 M (Figura 7).

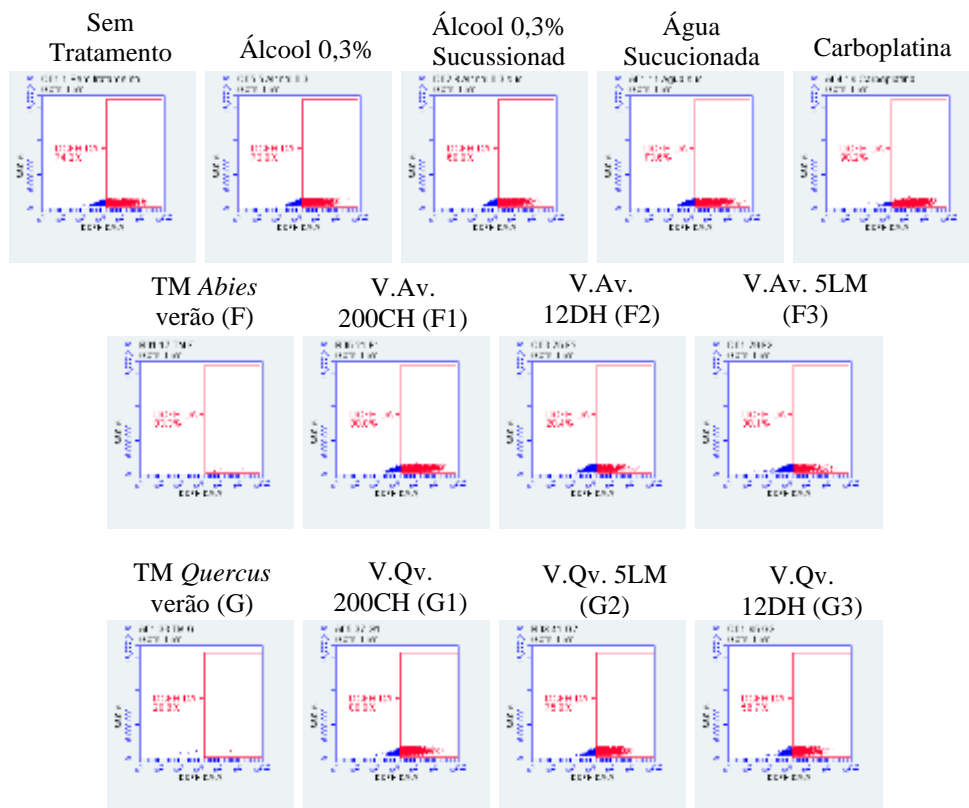
Figura 10: Dot-plots dos parâmetros utilizados para estabelecer o quadrante de positividade para intensidade de expressão de DCFH-DA nas amostras de células B16F10 tratadas ou não no tempo de 24 horas.



Fonte: própria.

Levando em consideração o percentual de expressão da sonda DCFH-DA nas células B16F10 viáveis (*gate* P1, Figura 11), estes percentuais foram menores nos grupos V.Av. 12DH (média=27,53%, $p < 0,0001$), V.Av. 5LM (média=29,84%, $p < 0,0001$), TM V.Qv. (média=55,48%, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo sem tratamento (média=77,48%); nos outros grupos de tratamento não foram observadas diferenças significantes. Já considerando o grupo Carboplatina (média=96,04%), os grupos V.Av. 12DH (média=27,53%, $p < 0,0001$), V.Av. 5LM (média=29,84%, $p < 0,0001$), TM V.Qv. (média=55,48%, $p < 0,0001$), V.Qv. 5LM (média=29,84%, $p < 0,01$) e V.Qv. 12DH (média=62,98%, $p < 0,001$) apresentaram menores percentuais; nos demais grupos avaliados não foram observadas diferenças.

Figura 11: Percentual de expressão de DCFH-DA dentre as células viáveis após 1 hora dos tratamentos.



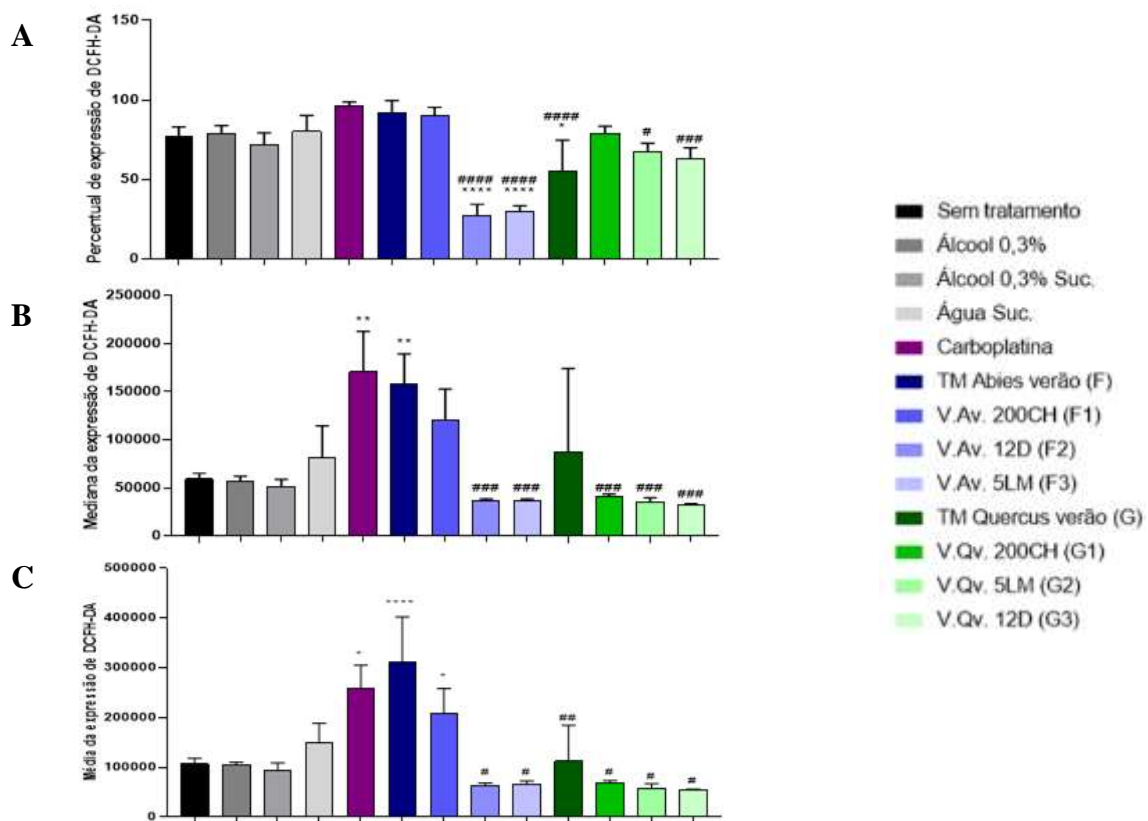
Dot-plots dos resultados obtidos nas análises de citometria de fluxo (DCFH-DA) das células B16F10 não tratadas, tratadas com os veículos (Álcool 0,3%, Álcool 0,3% Sucussionado e Água Sucucionada), com o quimioterápico Carboplatina, com a tintura mãe de VA de *Abies alba* de verão (V.Av.) bem como suas ultradiluições homeopáticas 12DH, 200CH e 5LM, e com a tintura mãe de VA de *Quercus robur* de verão (TM V.Qv.) bem como suas ultradiluições homeopáticas 12DH, 200CH e 5LM após 1 hora de tratamento. Quadrantes representam o percentual de expressão de DCFH-DA dentre as células vivas. Fonte: própria.

Em paralelo, dados obtidos de análises das medianas da intensidade de fluorescência da sonda DCFH-DA por célula (Figura 8B) mostram que os grupos tratados com Carboplatina (média=170975, $p<0,01$) e com TM V.Av. (média=158431, $p<0,01$) apresentaram maior expressão de EROs quando comparadas ao grupo sem tratamento. Os outros grupos não apresentaram diferenças significativas. Quando comparado com a Carboplatina os grupos V.Av. 12DH (média=36008, $p<0,001$), V.Av. 5LM (média=37016, $p<0,001$), V.Qv. 200CH (média=41200, $p<0,001$), V.Qv. 5LM (média=35354, $p<0,001$) e V.Qv. 12DH (média=32809, $p<0,001$) apresentaram menor expressão de EROs, já nos outros grupos não houve diferença.

Em contraste, análises da média de intensidade da fluorescência da sonda DCFH-DA por célula (Figura 8C), os grupos tratados com Carboplatina (média=259353, $p=0,001$), TM

V.Av. (média=312313, $p<0,0001$) e V.Av. 200CH (média=209290, $p<0,05$) apresentaram maior expressão de EROs quando comparados ao grupo sem tratamento (média=106541) nos outros grupos não foram observadas diferenças. Em relação à Carboplatina (média=259353), os grupos V.Av. 12DH (média=64153, $p<0,0001$), V.Av. 5LM (média=66657, $p<0,0001$), TM V.Qv. (média=112545, $p=0,001$), V.Qv. 200CH (média=69410, $p<0,0001$), V.Qv. 5LM (média=59361, $p<0,0001$) e V.Qv. 12DH (média=55221, $p<0,0001$) apresentaram menor expressão de EROs e nos outros grupos não foram observadas diferenças.

Figura 12: Expressão da sonda DCFH-DA nas células B16F10 após tratamentos.



Representação gráfica de: **A.** percentuais de expressão. **B.** medianas de intensidade de fluorescência e **C.** média, de intensidade de fluorescência por célula da expressão da sonda de DCFH-DA após 1 hora dos tratamentos. * indica $p<0,05$, ** = $p<0,1$; *** = $p<0,01$; **** = $p<0,001$ em relação ao grupo sem tratamento. # = $p<0,05$, ## = $p<0,1$; ### = $p<0,01$; #### = $p<0,001$ na comparação dos grupos em relação ao grupo Carboplatina. Fonte: própria.

4.5 Análises da produção de citocinas inflamatórias por células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de *Viscum album* (CBA).

Foram analisadas as citocinas inflamatórias IL-12p70, TNF, IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6 nos sobrenadantes dos grupos de estudo nos tempos de 24 e 48 horas. Para IL-12p70, no tempo de 24 horas, em relação ao grupo sem tratamento (média=0 pg/mL), houve aumento nos grupos TM V.Av. (média=111,96 pg/mL, $p<0,001$) e TM V.Qv. (média=115,89 pg/mL, $p<0,0001$), e não foram observadas diferenças significativas nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Água Suc. (média=51,75 pg/mL, $p=0,377$), Carboplatina (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 200CH (média=13,46 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 12DH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 5LM (média=0 pg/mL, $p=0,999$), V.Qv. 200CH (média=22,83 pg/mL, $p=0,994$), V.Qv. 5LM (média=23,91 pg/mL, $p=0,991$) e V.Qv. 12DH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$). Às 48 horas, comparando com o grupo controle sem tratamento (média=0 pg/mL), houve aumento da IL-12p70 apenas no grupo TM V.Av. (média=140,44 pg/mL, $p>0,0001$) e não houve diferença nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Água Suc. (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Carboplatina (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 200CH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 12DH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 5LM (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), TM V.Qv. (média=37,42 pg/mL, $p=0,814$), V.Qv. 200CH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Qv. 5LM (média=0 pg/mL, $p>0,9999$) e V.Qv. 12DH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$).

Na análise de TNF, comparando com o grupo controle sem tratamento às 24 horas (média=2,55 pg/mL), houve aumento apenas no grupo TM V.Av. (média=15,52 pg/mL, $p<0,05$), e não houve diferença nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, $p=0,9998$), Água Suc. (média=0 pg/mL, $p=0,9998$), Carboplatina (média=3,54 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 200CH (média=2,69 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 12DH (média=7,57 pg/mL, $p=0,943$), V.Av. 5LM (média=0 pg/mL, $p=0,9998$), TM V.Qv. (média=10,19 pg/mL, $p=0,540$), V.Qv. 200CH (média=6,24 pg/mL, $p=0,994$), V.Qv. 5LM (média=7,44 pg/mL, $p=0,953$) e V.Qv. 12DH (média=6,86 pg/mL, $p=0,981$). Às 48 horas, comparando com o grupo controle sem tratamento (média=0 pg/mL), houve aumento da TNF apenas no grupo TM V.Av. (média=20,11 pg/mL, $p<0,0001$), e não houve diferença nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Água Suc. (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Carboplatina (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 200CH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 12DH (média=2,47 pg/mL,

p=0,9999), V.Av. 5LM (média=2,84 pg/mL, p=0,999), TM V.Qv. (média=2,55 pg/mL, p=0,9998), V.Qv. 200CH (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Qv. 5LM (média=0 pg/mL, p>0,9999) e V.Qv. 12DH (média=0 pg/mL, p>0,9999).

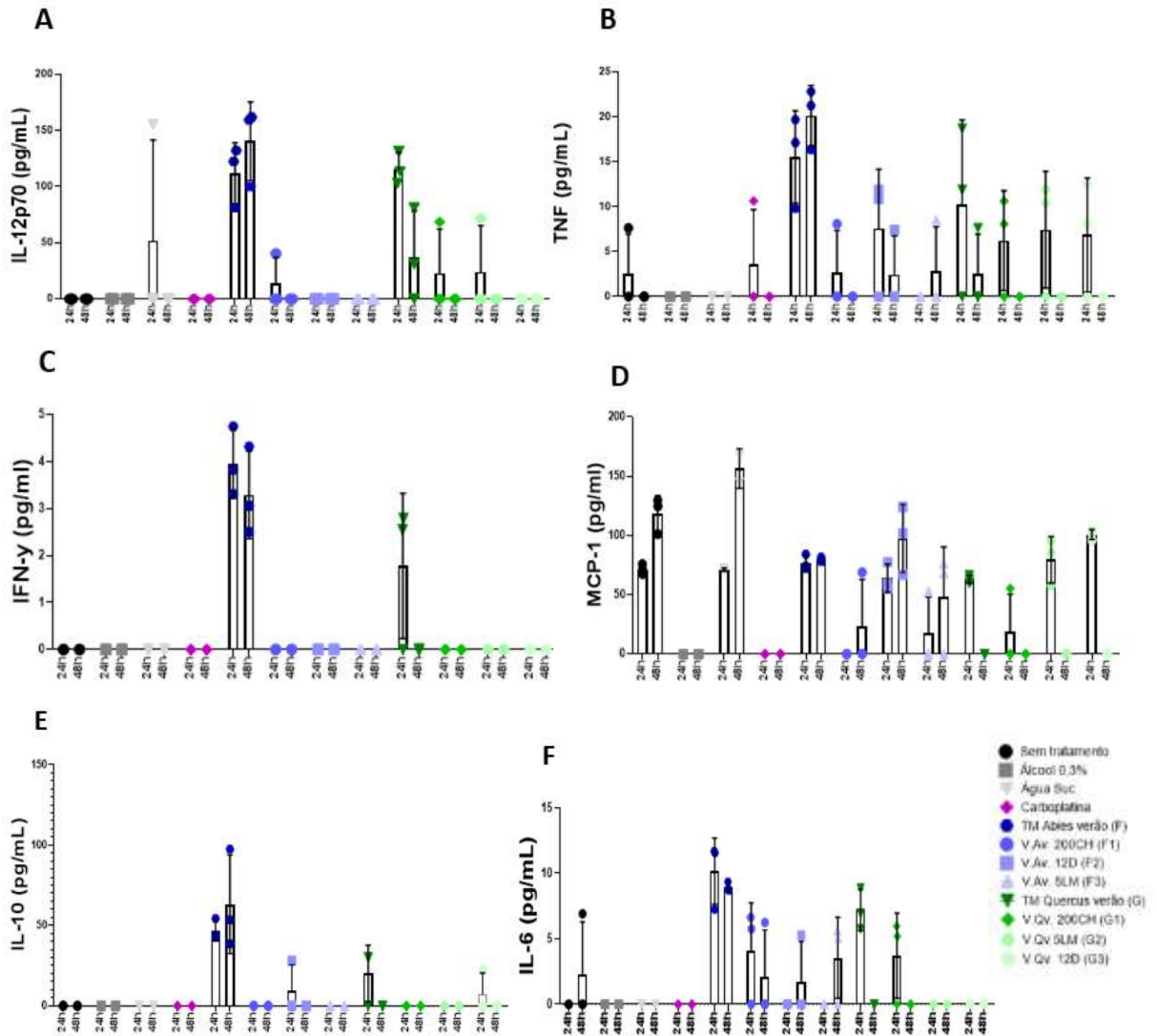
Na análise de IF- γ , comparando com o grupo controle sem tratamento às 24 horas (média=0 pg/mL), houve aumento nos grupos TM V.Av. (média=3,96 pg/mL, p<0,0001) e TM V.Qv. (média=1,78 pg/mL, p<0,0001), e não foi observada diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, p p>0,9999), Água Suc. (média=0 pg/mL, p>0,9999), Carboplatina (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Av. 200CH (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Av. 12DH (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Av. 5LM (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Qv. 200CH (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Qv. 5LM (média=0 pg/mL, p>0,9999) e V.Qv. 12DH (média=0 pg/mL, p>0,9999). Às 48horas, comparando com o grupo controle sem tratamento (média=0 pg/mL), houve aumento de IF- γ apenas no grupo TM V.Av. (média=3,29 pg/mL, p<0,0001), e não houve diferença nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, p>0,9999), Água Suc. (média=0 pg/mL, p>0,9999), Carboplatina (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Av. 200CH (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Av. 12DH (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Av. 5LM (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Qv. 200CH (média=0 pg/mL, p>0,9999), V.Qv. 5LM (média=0 pg/mL, p>0,9999) e V.Qv. 12DH (média=0 pg/mL, p>0,9999).

Na análise de MCP-1, comparando com o grupo controle sem tratamento às 24 horas (média=71,49 pg/mL), não houve aumento em nenhum dos grupos do estudo, não sendo observada diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, p=0,071), Água Suc. (média=47,50 pg/mL, p=0,993), Carboplatina (média=0 pg/mL, p=0,071), TM V.Av. (média=76,83 pg/mL, p>0,9999), V.Av. 200CH (média=0 pg/mL, p=0,071), V.Av. 12DH (média=64,03 pg/mL, p>0,9999), V.Av. 5LM (média=17,59 pg/mL, p=0,375), TM V.Qv. (média=63,08 pg/mL 0 pg/mL, p>0,9999), V.Qv. 200CH (média=18,43 pg/mL, p=0,398), V.Qv. 5LM (média=79,57 pg/mL pg/mL, p>0,9999) e V.Qv. 12DH (média=100,87 pg/mL, p=0,967). Às 48horas, comparando com o grupo controle sem tratamento (média=118,58 pg/mL), houve diminuição da expressão da MCP-1 nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, p<0,0001), Carboplatina (média=0 pg/mL, p<0,0001), V.Av. 200CH (média=23,01 pg/mL, p<0,01), TM V.Qv. (média=0 pg/mL, p<0,0001), V.Qv. 200CH (média=0 pg/mL, p<0,0001), V.Qv. 5LM (média=0 pg/mL, p<0,0001) e V.Qv. 12DH (média=0 pg/mL, p<0,0001), e não houve diferença nos grupos Água Suc. (média=104,37 pg/mL, p>0,9999), TM V.Av. (média=79,48 pg/mL, p=0,809), V.Av. 12DH (média=97,59 pg/mL, p=0,998), V.Av. 5LM (média=48,26 pg/mL, p=0,081).

Na análise de IL-10, comparando com o grupo controle sem tratamento às 24 horas (média=0 pg/mL), houve aumento apenas no grupo TM V.Av. (média=46,91 pg/mL, $p<0,0001$), e não foi observada diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Água Suc. (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Carboplatina (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 200CH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 12DH (média=9,36 pg/mL, $p=0,966$), V.Av. 5LM (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), TM V.Qv. (média=20,17 pg/mL, $p=0,167$), V.Qv. 200CH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Qv. 5LM (média=0 pg/mL, $p>0,9999$) e V.Qv. 12DH (média=7,51 pg/mL, $p=0,994$). Às 48 horas, comparando com o grupo controle sem tratamento (média=0 pg/mL), houve aumento da IL-10 apenas no grupo TM V.Av. (média=63,20 pg/mL, $p<0,0001$), e não houve diferença nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Água Suc. (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Carboplatina (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 200CH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 12DH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 5LM (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), TM V.Qv. (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Qv. 200CH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Qv. 5LM (média=0 pg/mL, $p>0,9999$) e V.Qv. 12DH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$).

Na análise IL-6, comparando com o grupo controle sem tratamento às 24 horas (média=0 pg/mL), houve aumento nos grupos TM V.Av. (média=10,17 pg/mL, $p<0,0001$) e TM V.Qv. (média=7,21 pg/mL, $p<0,001$), e não foi observada diferença significativa nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Água Suc. (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), Carboplatina (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 200CH (média=4,14 pg/mL, $p=0,226$), V.Av. 12DH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 5LM (média=0 pg/mL, $p>0,9999$), V.Qv. 200CH (média=3,73 pg/mL, $p=0,369$), V.Qv. 5LM (média=0 pg/mL, $p>0,9999$) e V.Qv. 12DH (média=0 pg/mL, $p>0,9999$). Às 48 horas, comparando com o grupo controle sem tratamento (média=2,31 pg/mL), houve aumento da IL-6 apenas no grupo TM V.Av. (média=8,96 pg/mL, $p<0,01$), e não houve diferença nos grupos Álcool 0,3% (média=0 pg/mL, $p=0,920$), Água Suc. (média=0 pg/mL, $p=0,920$), Carboplatina (média=0 pg/mL, $p=0,920$), V.Av. 200CH (média=2,08 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 12DH (média=1,76 pg/mL, $p>0,9999$), V.Av. 5LM (média=3,56 pg/mL, $p=0,999$), TM V.Qv. (média=0 pg/mL, $p=0,920$), V.Qv. 200CH (média=0 pg/mL, $p=0,920$), V.Qv. 5LM (média=0 pg/mL, $p=0,920$) e V.Qv. 12DH (média=0 pg/mL, $p=0,920$).

Figura 13: Expressão de citocinas do perfil inflamatório células B16F10 após tratamentos

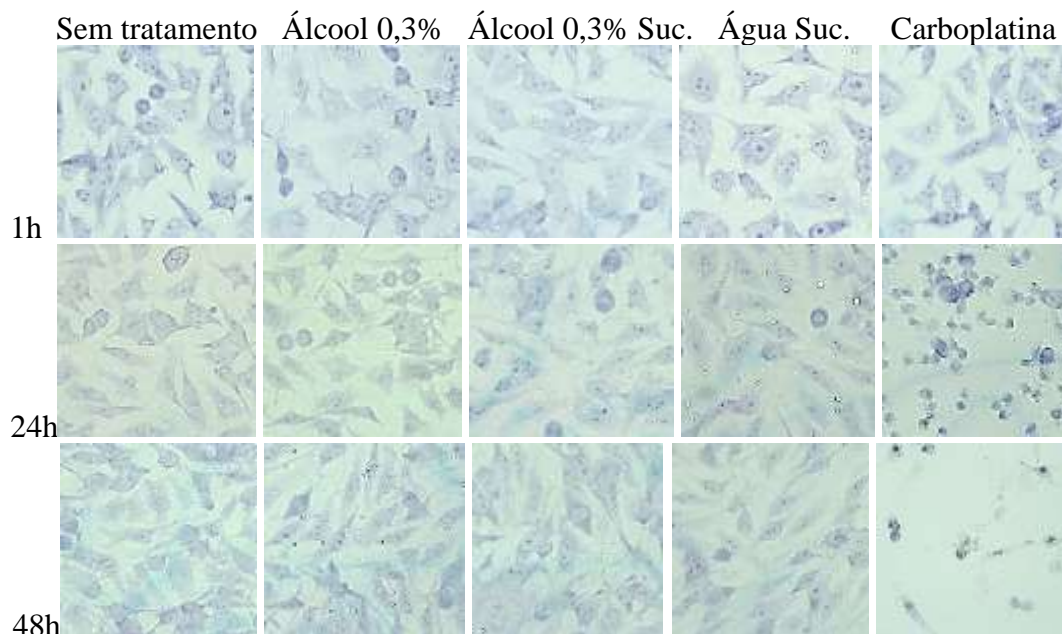


Representação gráfica da expressão de: **A.** IL-12p70. **B.** TNF **C.** IFN- γ **D.** MCP1 **E.** IL10 **E.** IL6. após 1 hora dos tratamentos. Fonte: própria.

4.6 Análises morfológicas das células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de *Viscum album* (coloração de GIEMSA).

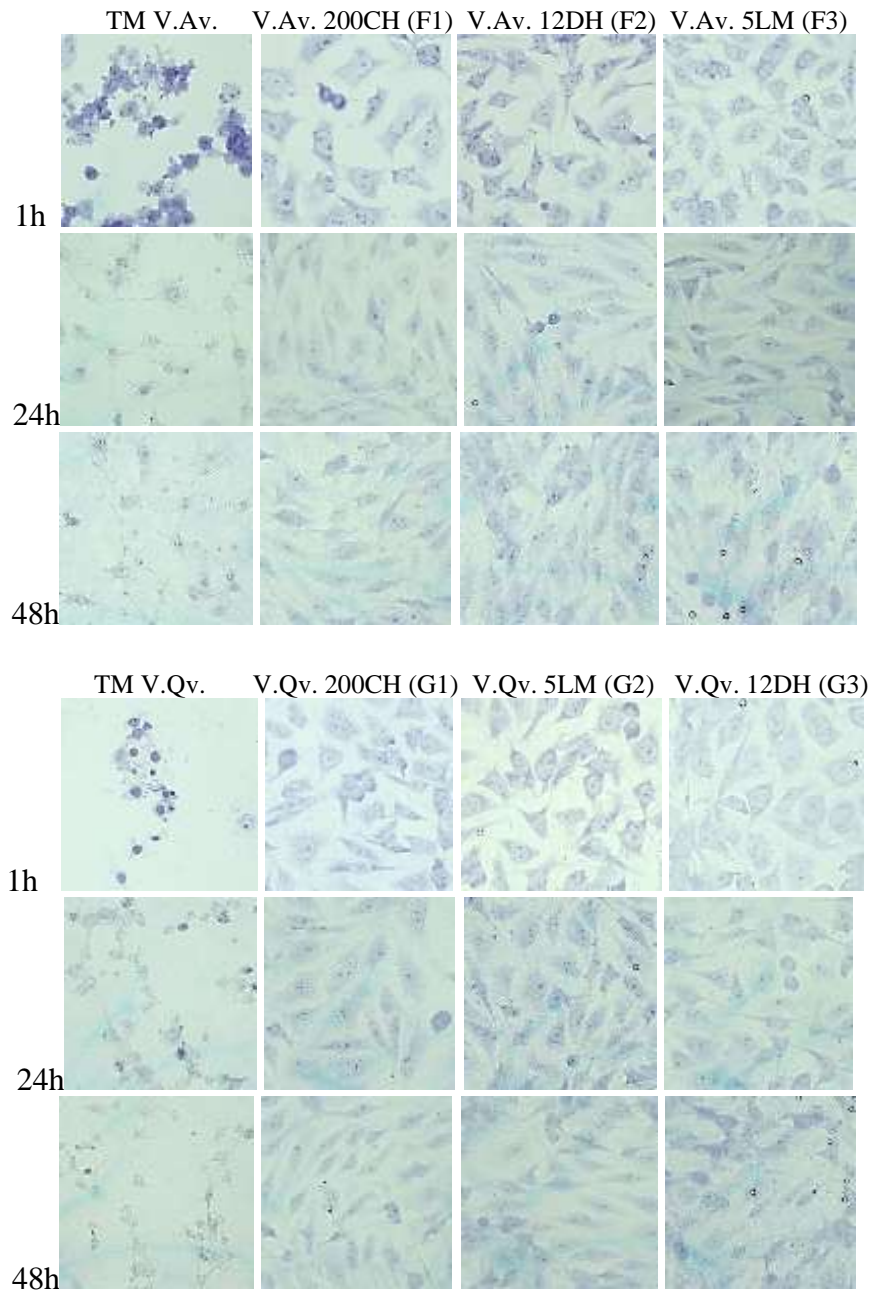
Análises das características morfológicas das células B16F10 antes dos tratamentos, após 24, 48 e 72 horas de cultura evidenciaram relação núcleo citoplasma aumentada, com membrana citoplasmática organizada, nucléolos evidentes com mínimo de dois por célula e, ressaltando a presença de várias células em mitose. Não foram observadas alterações na morfologia das células após nenhum dos tratamentos em nenhum dos tempos, com exceção da carboplatina que a partir de 24 horas passou a apresentar células menores, com vacuolização citoplasmática, condensação nuclear e corpos apoptóticos. As TMs com 1 hora que passam a apresentar restos celulares e células com citoplasma fortemente corado e de bordos indefinidos, além de imagens sugestivas de cariólise e picnose. Nos tempos seguintes, o tratamento das células com as TMs apresentam também citoplasma vacuolizado e núcleo sem definição, semelhantes a células liquefativas (Figura 14, 15 e 16).

Figura 14: Morfologia das células B16F10 após tratamentos



Fotomicrografias de lamínulas coradas pelo método de Giemsa com células B16F10, tratadas com os veículos (Álcool 0,3%, Álcool 0,3% Sucussionado e Água Sucucionada), com o quimioterápico Carboplatina após 1, 24 e 48 horas de tratamento.

Figura 15: Morfologia das células B16F10 após tratamentos.



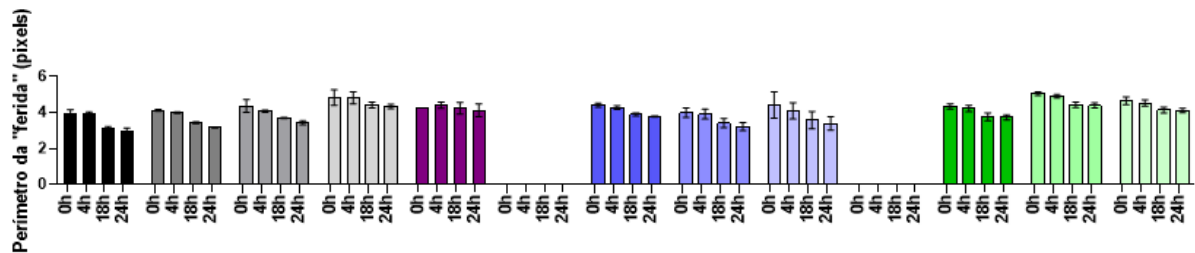
Fotomicrografias de lamínulas coradas pelo método de Giemsa com células B16F10, tratadas com a tintura mãe de VA de *Abies alba* de verão (TM V.Av.) bem como suas ultradiluições homeopáticas 12DH, 200CH e 5LM, e com a tintura mãe de VA de *Quercus robur* de verão (TM V.Qv.) bem como suas ultradiluições homeopáticas 12DH, 200CH e 5LM após 1, 24 e 48 horas de tratamento.

4.7 Análises da capacidade de migração das células B16F10 após tratamentos com preparações homeopáticas de *Viscum album* (*Wound Healing*).

A capacidade de migração das células B16F10 foi determinada com a mensuração dos perímetros das feridas realizadas nas culturas celulares nos tempos 0, 4, 18 e 24 horas. Em todos os grupos de tratamento, não houve diferença significativa nas médias dos perímetros registrados entre 0 e 24 horas, com exceção dos grupos V.Av. e V.Qv., nos quais houve morte celular após 1 hora de tratamento e não foi possível realizar o ensaio (Figura 16, 17, 18 e 19).

Figura 16: Análises de migração das células B16F10 após tratamentos e avaliadas nos tempos de 0, 4, 18 e 24 horas depois de realizada a ferida.

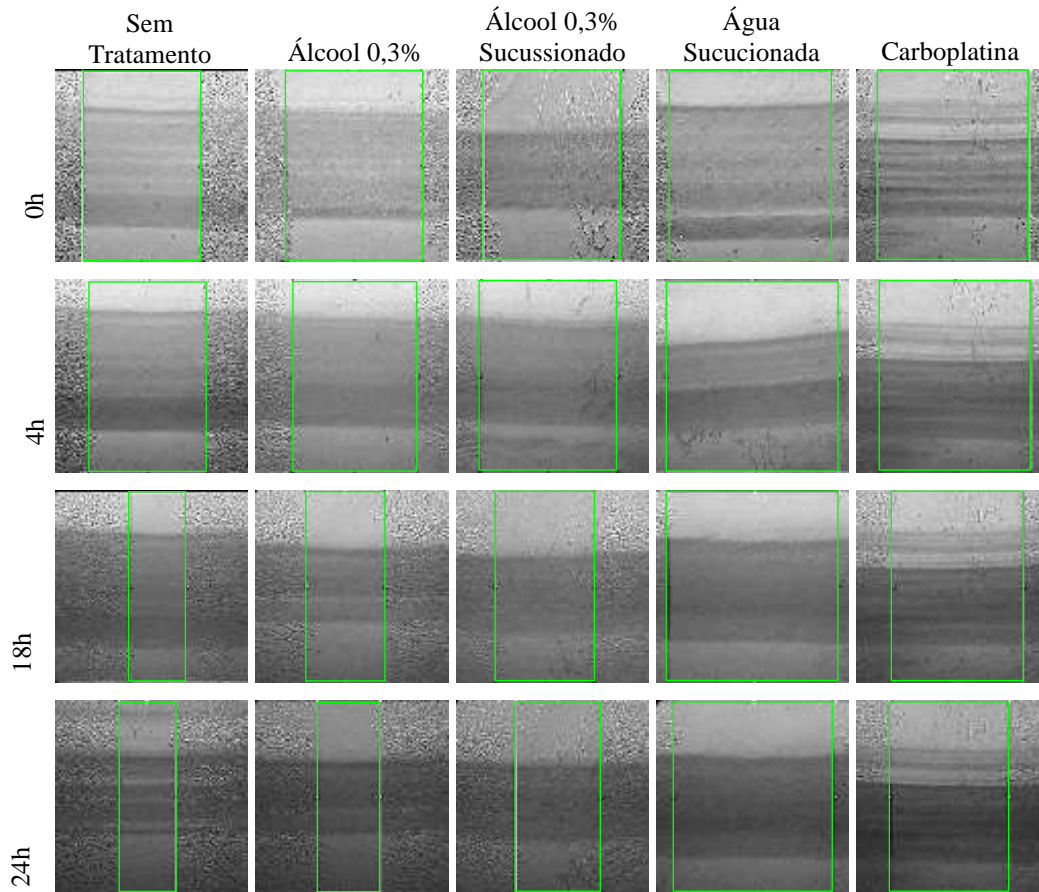
A



B Grupo	0h vs. 24h	P valor
Sem tratamento	*	0.0211
Álcool 0,3%	Ns	0.0597
Álcool 0,3% Suc.	Ns	0.3785
Água Suc.	Ns	0.4661
Carboplatina	Ns	0.9242
<i>Abies</i> verão (F)	X	X
V.Av. 200CH (F1)	Ns	0.0921
V.Av. 12DH (F2)	Ns	0.4677
V.Av. 5LM (F3)	Ns	0.6869
<i>Quercus robur</i> (G)	X	X
V.Qv. 200CH (G1)	Ns	0.3703
V.Qv. 5LM (G2)	Ns	0.3006
V.Qv. 12DH (G3)	Ns	0.1434

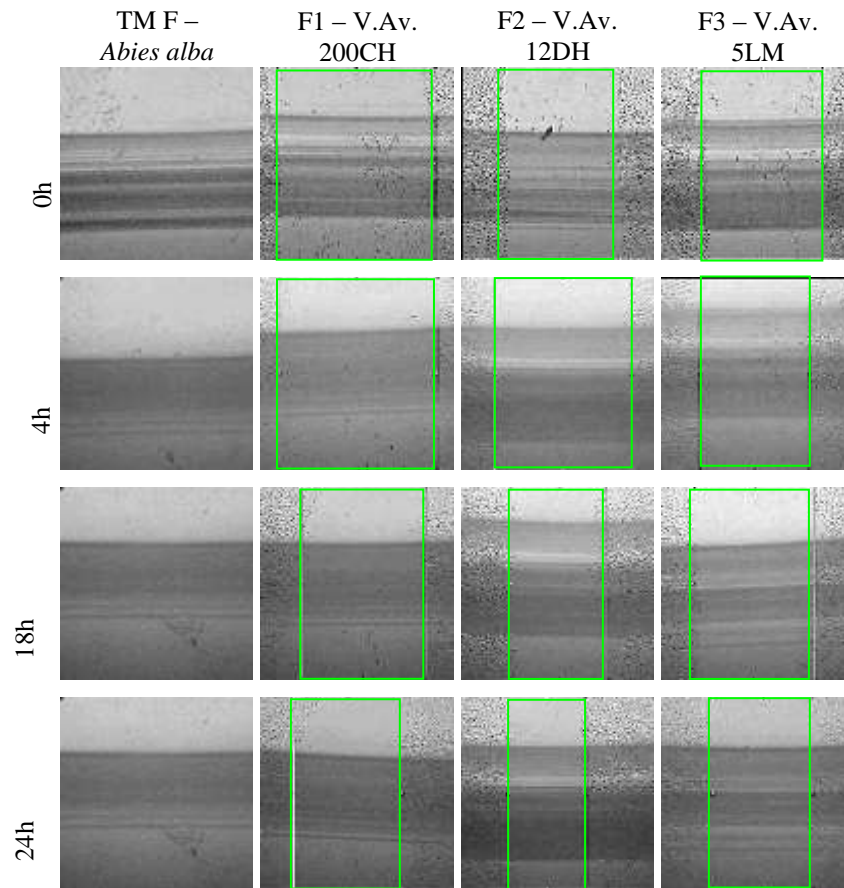
A Representação gráfica das médias das medidas dos perímetros das feridas, em pixels, após 0, 4, 18 e 24 horas da ferida. **B** Tabela da significância da diferença entre os perímetros das feridas entre os tempos de 0 e 24 horas. Ns = não significativo; X = valores não obtidos. Fonte: própria.

Figura 17: Fotomicrografias das células B16F10 após ferida na monocamada celular e tratadas ou não com os grupos controle.



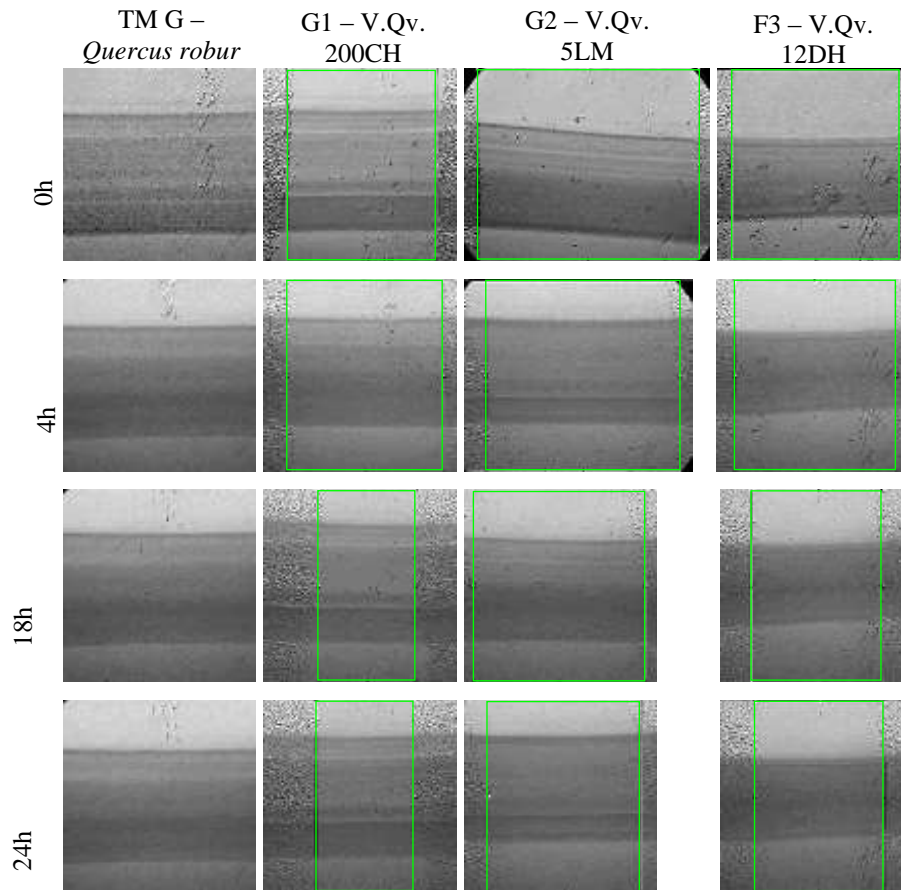
Células B16F10 tratadas ou não com os veículos (álcool 0,3%, álcool 0,3% sucussionado, água sucucionada) ou quimioterápico Carboplatina, nos tempos de 0, 4, 18 e 24 horas após a ferida, que corresponde à área de descontinuidade da monocamada celular criada pela ação traumática de ponteira de 1000 μ L. Fonte: própria.

Figura 18: Fotomicrografias das células B16F10 após ferida na monocamada celular e tratadas com TM V.Av. ou suas diluições.



Células B16F10 tratadas com TM V.Av. ou suas respectivas ultradiluições homeopáticas (12DH, 200CH e 5LM), nos tempos de 0, 4, 18 e 24 horas após a ferida, que corresponde à área de descontinuidade da monocamada celular criada pela ação traumática de ponteira de 1000 μ L. Fonte: própria.

Figura 18: Fotomicrografias das células B16F10 após ferida na monocamada celular e tratadas com TM V.Qv. ou suas diluições.



Células B16F10 tratadas com TM V.Qv. ou suas respectivas ultradiluições homeopáticas (12DH, 200CH e 5LM), nos tempos de 0, 4, 18 e 24 horas após a ferida, que corresponde à área de descontinuidade da monocamada celular criada pela ação traumática de ponteira de 1000 μL . Fonte: própria.

5 DISCUSSÃO

O ensaio de MTT é comumente utilizado para determinar viabilidade celular, uma vez que o formazan consiste em um produto de coloração arroxeadada, formado a partir da ação de redutase mitocondrial sobre o sal tetrazolio de coloração amarelada. Com isso, pode-se inferir a presença ou não de células vivas, porém, adicionalmente, ao haver mudanças no metabolismo celular, pode-se detectar o estresse das células quando expostas à determinadas substâncias (TAMIELO, 2013; KUMAR, 2018; LUIS et al., 2019). Já o ensaio de Cristal Violeta é um teste amplamente usado para verificação da manutenção da viabilidade celular, de forma que o corante se liga a proteínas e DNA de células que se mantêm fixas ao fundo dos poços nas placas de cultura, ou seja, células vivas, sendo uma quantificação indireta de morte celular, mas que não caracteriza sua causa (TAMIELO, 2013; FEOKTISTOVA, 2016; SONG et al., 2019).

Neste estudo, as tinturas mães do *Viscum album* obtidos das arvores *Quercus robur* e *Abies alba*, tanto no verão como no inverno, promoveram diminuição progressiva do metabolismo bem como da viabilidade celular similar ao quimioterápico carboplatina. No ensaio de MTT, as diminuições no metabolismo celular ($p < 0,001$) foram de até 80% (V.Av.), 82% (V.Ai.), 82% (V.Qv.) e 81% (V.Qi.), em relação às células não tratadas (controle negativo), e sem significância em relação à Carboplatina (controle positivo). Apresentaram ainda, no ensaio de Cristal Violeta, diminuições na viabilidade celular ($p < 0,001$) de até 50% (V.Av.), 44% (V.Ai.), 45% (V.Qv.) e 39% (V.Qi.), em relação ao controle negativo e sem significância em relação ao controle positivo. Estes resultados estão em concordância com outros estudos, nos quais foi mostrado o efeito antitumoral das tinturas mães do *Viscum album* sobre diversas linhagens tumorais, tanto *in vitro* como *in vivo* (BONAMIN; DE CARVALHO; WAISSE, 2017; MELO et al., 2018; HOLANDINO et al., 2020).

Em relação aos resultados obtidos nos tratamentos com potências homeopáticas, este é o primeiro estudo na literatura que mostra os diferentes efeitos destes tratamentos sobre as células B16F10. Alguns tratamentos induziram oscilações no metabolismo celular e diminuição progressiva da viabilidade (diluições de V.Av.: 3DH, 12DH, 30DH, 200CH), outros levaram a oscilações tanto no metabolismo quanto na viabilidade (diluições de V.Av.: 6CH, 30CH, 2LM, 3LM, 5LM; e V.Ai. 5LM; e V.Qv. 200CH), outros desencadearam aumento progressivo no metabolismo com oscilações na viabilidade (diluições de V.Ai.: 6CH, 2LM, 3LM; e diluições de V.Qv.: 3DH e 30CH) e outros mostraram efeitos variados em relação ao metabolismo, com marcada diminuição da viabilidade em 24 horas, que não se sustentou ao longo do tempo (todas

as potências derivadas de V.Ai.; as diluições de V.Ai: 3DH, 12DH, 30DH, 30CH, 200CH; as diluições de V.Qv.: 12DH, 30DH, 6CH, 2LM, 3LM, 5LM). Os resultados aqui apresentados são inéditos e de grande valia, uma vez que até o momento, este é o primeiro estudo avaliando os efeitos de ultradiluições de VA preparadas em escalas de diluição diferentes, provenientes de TMs de VA colhidas de árvores e estações do ano distintas.

Com os dados obtidos nos ensaios de MTT e Cristal violeta, foram selecionados aqueles tratamentos que exibiram efeitos significativamente diferentes em relação às células não tratadas, e com respostas semelhantes ou aproximadas ao tratamento com o quimioterápico, para as análises dos mecanismos de ação de destes medicamentos (Fase II do delineamento experimental).

Considerando estudos prévios, onde as tinturas mães preparadas a partir de *Viscum* colhido no verão apresentam maior quantidade de viscotoxinas (HOLANDINO et al., 2018; HOLANDINO et al., 2020), neste estudo todas as TMs testadas tiveram resultados semelhantes à Carboplatina em relação ao metabolismo e à viabilidade celular, e não foi observada diferença significativa entre as colhidas no verão ou no inverno. Contudo, apesar de não se esperar um efeito citotóxico, as homeopáticas derivadas de TMs de verão apresentaram padrões de resposta mais coerentes com os achados em literatura para ultradiluições homeopáticas (BELLAVITE et al., 2015).

Nas potências homeopáticas derivadas da TM de V.Av, o ensaio de Cristal Violeta apresentou diminuição da viabilidade celular e dentre as ultradiluições respectivas, a potência 12 na escala decimal (12DH) apresentou a maior diminuição de viabilidade celular às 72 horas, em relação ao controle negativo (21%; $p < 0,01$). Na escala centesimal, a potência 200CH foi aquela que apresentou uma diminuição de viabilidade celular progressiva ao longo do tempo no ensaio de Cristal Violeta.

Nas potências homeopáticas derivadas da TM de V.Qv., no ensaio de MTT, houve aumento do metabolismo ao longo do tempo na escala decimal. Esse comportamento começa a se inverter no grupo de potências centesimais e termina com uma inversão completa do padrão, ou seja, o metabolismo celular diminui ao longo do tempo nas potências cinquenta milésimas. Essa flutuação ao longo das escalas de diluição denota um comportamento característico de diluições homeopáticas (BELLAVITE et al., 2015). Dentro da escala decimal, no ensaio MTT, a potência 12DH apresentou uma curva em “J” bem definida, com um aumento acentuado do metabolismo ao longo do tempo, sendo 67% maior que o controle negativo às 72 horas

($p < 0,001$). Na escala de diluição cinquenta milésima, a potência 5LM apresentou uma curva em “J invertido” semelhante ao observado nas TMs e no controle positivo, ainda que tenha apresentado diferenças significativas em relação à Carboplatina em todos os tempos, o padrão de resposta encontrado necessita melhor entendimento.

Considerando estas análises, os tratamentos selecionados para a Fase II de experimentos foram as TMs de V.Av. e V.Qv. e suas respectivas diluições nas potências: 12DH, 200CH e 5LM. As potências 5LM de V.Av. e 200CH de V.Qv. foram selecionadas para manter o mesmo padrão de diluição nos ensaios seguintes, que foram realizados para verificação de apoptose/necrose, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), liberação de citocinas inflamatórias, análise da morfologia celular e migração.

O ensaio de Anexina – 7AAD por citometria de fluxo analisa quantitativamente e qualitativamente tanto a viabilidade quanto a morte celular, de forma que as células não marcadas com nenhum dos reagentes são lidas como viáveis (Anexina⁻ 7AAD⁻), aquelas marcadas positivamente para Anexina e negativamente para 7AAD são entendidas como em apoptose (Anexina⁺ 7AAD⁻), as células negativas para a marcação com Anexina e positivas para 7AAD (Anexina⁻ 7AAD⁺) são contadas como em necrose e por fim as células em apoptose tardia ou necrose apresentam dupla marcação, sendo positivas tanto para Anexina quanto para 7AAD. Os resultados são expressos na forma de porcentagem dentro de seus quadrantes específicos (ZIMMERMANN; MEYER, 2011).

Estudos demonstram os efeitos antitumorais das tinturas mães de *Viscum album* extraídas das árvores hospedeiras *Abies alba* e *Quercus robur* com efeito citotóxico sobre células de melanoma murino B6F10 (MELO et al., 2018). Considerando o percentual de viabilidade, as TMs V.Av. e V.Qv. promoveram os menores percentuais em todos os tempos avaliados, similar à carboplatina e tendo resultados significativamente menores no tempo de 1 hora. Estudos *in vitro* mostram os efeitos de homeopatia em células tumorais, com a maioria dos seus mecanismos relacionados com a ativação das vias de apoptose e controle de crescimento celular (BONAMIN; WAISSE, 2019). No presente estudo, as homeopatias apresentaram uma flutuação da viabilidade ao longo do tempo diferente da observada no grupo sem tratamento. Sendo que V.Av. 12DH e 200CH não apresentaram diferenças nos tempos de 1, 24 e 48 horas, porém houve maior viabilidade ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente) às 72 horas de tratamento. A homeopatia de V.Av. 5LM não apresentou diferença, em relação ao grupo não tratado, na primeira hora, com maior viabilidade às 24 horas ($p < 0,01$), sem diferença às 48 horas e menor ($p < 0,001$) às 72 horas. Os tratados com V.Qv. 5LM e 12DH apresentaram maior

percentual de células viáveis após 1 e 24 horas, sem diferença às 48 horas e maior às 72 horas. O grupo tratado com V.Qv. 200CH não apresentou diferença na primeira hora, no entanto, houve maior viabilidade às 24 horas, menor às 48 horas e maior às 72 horas. A flutuação da viabilidade com aumento às 24 horas seguido de redução às 48 horas observado no grupo V.Qv. 200CH foi similar ao observado em pesquisa do grupo (BÉJA, 2020).

Em todos os grupos testados, com exceção da Carboplatina, TM V.Av. e TM V.Qv., houve redução da viabilidade celular após 72 horas, semelhante ao grupo não tratado. Esse efeito pode ser atribuído ao rápido crescimento das células B16F10, que às 72 horas espera-se atingir confluência de 100% ou mais, o que pode levar ao sofrimento e alguma celular. No entanto, no grupo V.Qv. 200CH, a viabilidade celular foi mantida das 48 às 72 horas, por isso, supõe-se que tenha havido uma modulação do crescimento destas células, uma vez que não houve o declínio de viabilidade como observado no grupo não tratado.

Ao observarmos o Gráfico 4 vemos que a variação das médias dentro dos grupos V.Av. 200CH, V.Av. 5LM, V.Qv.12DH e V.Qv. 5LM é similar nos três primeiros tempos, mantendo o percentual de células vivas estável neste período, seguido de queda às 72 horas. Diferente disto, a viabilidade das células não tratadas reduziu às 24 horas, se recuperou às 48 horas para enfim declinar às 72 horas, o que pode estar relacionado com morte natural inerente à rápida taxa de crescimento inicial destas células. Diante disto, podemos supor que as homeopatas de VA dos grupos citados promoveram a modulação da viabilidade, possivelmente por mecanismos de controle das taxas de crescimento, já que no ensaio de MTT essas homeopatas apresentaram diminuição do metabolismo celular.

Com relação ao percentual de apoptose nenhum dos tratamentos apresentou diferenças em relação ao grupo não tratado em nenhum dos tempos. A Carboplatina foi o único grupo que apresentou maiores percentuais de células em apoptose nos tempos de 24 ($p < 0,01$) e 48 horas ($p < 0,05$), sendo que este constitui o principal mecanismo de ação deste quimioterápico, pois reage com o DNA causando a ativação das vias de sinalização de apoptose (FLOROS et al., 2004).

As análises de apoptose tardia/necrose mostraram que as TMs induziram os maiores percentuais de morte por estas vias em todos os tempos, de forma que houve diferença entre a TM V.Av. ($p < 0,01$) e ambos os controles (negativo e positivo) logo após 1 hora de tratamento. Com 24 horas de tratamento, as TMs V.Av. ($p < 0,01$) e V.Qv. ($p < 0,0001$) apresentaram diferenças tanto em relação ao grupo sem tratamento quanto em relação ao grupo tratado com

Carboplatina. Às 48 horas, comparando ao grupo sem tratamento, as TMs V.Av. ($p < 0,0001$) e V.Qv. ($p < 0,01$) apresentaram diferenças, bem como às 72 horas ($p < 0,01$), e deixando de apresentar diferenças em relação à Carboplatina nestes últimos tempos.

As homeopatas apresentaram comportamentos variados ao longo do tempo comparando ao grupo sem tratamento, sendo que V.Av. 200CH e V.Qv. 200CH não apresentaram diferenças nos tempos de 24 e 48 horas, passando a apresentar nas horas seguintes, sendo maiores às 48 horas (V.Av. 200CH: $p < 0,05$; V.Qv. 200CH: $p < 0,01$) e menores às 72 horas (V.Av. 200CH: $p < 0,01$; V.Qv. 200CH: $p < 0,01$). O grupo tratado com V.Av. 12DH não apresentou diferenças nos tempos de 1 e 48 horas, tendo diferença maior ($p < 0,05$) no tempo de 24 horas e menor ($p < 0,01$) às 72 horas. As homeopatas de V.Av. 5LM e V.Qv. 5LM não apresentaram diferenças nos três primeiros tempos, com diminuição significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente) às 72 horas. Já o tratamento de V.Qv. 12DH não apresentou diferença em nenhum dos tempos.

Em relação ao percentual de células em necrose, no tempo de 1 hora, nenhum dos grupos apresentou diferença significativa no percentual de necrose, em relação às células sem tratamento. Às 24 horas, todos os grupos de tratamento apresentaram menor percentual de células necróticas (com ao menos $p < 0,01$). Às 48 horas, o grupo V.Qv. 200CH foi o único que demonstrou aumento do percentual de necrose e por fim, às 72 horas, nenhum grupo apresentou diferença significativa do percentual de necrose em relação ao não tratado.

Correlacionando estes resultados com estudos prévios do grupo, avaliando TM de *Phytolacca decandra*, foi observado efeito citotóxico desta tintura mãe de sobre células de adenocarcinoma mamário humano (MCF7) com uma maior sinalização de morte celular por apoptose. O mesmo foi encontrado em suas diluições homeopáticas (30CH e 200CH) (BÉJA, 2020). Pesquisas mostram que as TMs de VA colhidas no verão produzem mais viscotoxinas, e estas induzem a morte de células tumorais por necrose (HOLANDINO et al., 2018; HOLANDINO et al., 2020). As células B16F10 tratadas com V.Qv. 200CH causaram morte celular por necrose às 48 horas, no entanto outros estudos são necessários para compreender este dado isolado.

Diretamente ligada aos percentuais de vida e morte celular está a produção de EROs, sendo que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são constantemente produzidas e eliminadas nos sistemas biológicos, tendo um papel importante nas funções bioquímicas fisiológicas e no processo patológico (PELICANO, CARNEY, HUANG, 2004). Estudos mostram que células

tumorais estão sob estresse oxidativo aumentado, associado com a transformação oncogênica, alteração metabólica e aumento na produção de EROs (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). Este aumento das quantidades de EROs pode levar a estímulo da proliferação células, promoção de mutações e instabilidade genética, além da alteração da sensibilidade celular à medicamentos antineoplásicos (PELICANO, CARNEY, HUANG, 2004). Por outro lado, terapias anticâncer possuem mecanismos que levam ao aumento da produção de EROs e morte celular (KOCYUGIT; GULER, 2017; CHEN et al., 2020; WANG et al., 2021).

A sonda fluorescente DCFH-DA é um marcador direto da produção de EROs, pois quanto maior a presença de corpos oxidantes, maior será sua expressão (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010). O cálculo da mediana da expressão de DCFH-DA mostra que apenas os grupos Carboplatina ($p < 0,01$) e TM V.Av. ($p < 0,01$) apresentaram níveis maiores que o grupo sem tratamento. Estes resultados estão de acordo com o esperado para tais tratamentos, devido à citotoxicidade dos mesmos (FLOROS et al., 2004; HOLANDINO et al., 2020).

Em contraste, nos tratamentos com as homeopáticas V.Av. 12DH e 5LM, bem como V.Qv. 12DH, 200CH e 5LM, a expressão da sonda foi menor ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo Carboplatina e, sem diferença em relação as células sem tratamento. Entretanto, dentre as células viáveis, houve menor percentual de expressão de DCFH-DA nas ultradiluições de V.Av. 12DH e 5LM ($p < 0,0001$) comparado aos controles sem tratamento e carboplatina, e nas homeopáticas de V.Qv. 12DH e 5LM comparado com a carboplatina ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente).

Considerando que as células neoplásicas normalmente estão sob maior estresse oxidativo e que este é um fator de agravamento nos quadros oncológicos (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020), o menor percentual de células produzindo EROs nos grupos V.Av. 12DH e 5LM pode ser atribuído à um efeito regulatório do estresse oxidativo. Entretanto vemos em V.Av. 200CH uma maior intensidade de EROs, o que sugere possível sinalização de sobrevivência, uma vez que esta não apresenta citotoxicidade. Ao contrário de V.Qv. 200CH que apresentou citotoxicidade sem aumento na intensidade da expressão de EROs.

Em relação à expressão de citocinas inflamatórias após os tratamentos com as ultradiluições, diferenças estatísticas foram observadas em alguns grupos quando comparados ao grupo sem tratamento.

A família da interleucina-12 possui um importante papel no sistema imunológico, agindo principalmente como indutora da imunidade por células, sendo a IL-12p70 sua forma

bioativa (GEE et al., 2009). Por sua potente ação pró-inflamatória, a IL-12 é empregada na imunoterapia para o câncer, sendo que seu emprego via eletrotransferência foi eficaz para o tratamento de células de melanoma murino B16F10, levando à remissão completa em 71% dos camundongos tratados (KOMEL et al., 2021). Neste estudo foi observado que apenas as TMs apresentaram maior expressão de IL-12p70 nos tempos de 24 e 48 horas, tanto em comparação ao grupo não tratado quanto à Carboplatina.

O TNF- α é uma citocina com efeitos pleiotrópicos em células normais e neoplásicas. Possui efeitos pró-inflamatórios e pró-apoptóticos (KALE et al., 2018), contribuindo com a invasividade tumoral juntamente com a IL-1 β e IL-6 (MANTOVANI et al., 2014). Camundongos que não produzem TNF- α possuem resistência à carcinogênese em pele (MOORE et al., 1999). No entanto, a expressão reduzida de TNF- α , juntamente com o Interferon- γ (IFN- γ) nos leucócitos do baço de camundongos com melanoma causou aumento da metástase pulmonar (NAKASONE et al., 2012). Neste ensaio apenas a TM V.Av. apresentou maior expressão de TNF em comparação aos controles sem tratamento e Carboplatina nos tempos de 24 ($p < 0,05$) e 48 horas ($p < 0,0001$).

O IFN- γ é uma citocina que desempenha um papel importante na imunovigilância, auxiliando as células do sistema imune a atacar células neoplásicas em desenvolvimento. Sua produção endógena possui efeito protetor contra o crescimento de tumores implantados, quimicamente induzidos ou espontâneos (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). O IFN- γ promove a geração de células T CD4+ específicas para tumor, T-helper do tipo 1 (Th1), células citolíticas e ativação de macrófagos com ação citocida. Modulando a resposta antitumoral mediada pela imunidade inata e adaptativa, além da imunogenicidade tumoral (MARCHI et al., 2011). Nesta avaliação a TM V.Av. apresentou maior expressão de IFN- γ quando comparada as células sem tratamento ($p < 0,0001$) e à carboplatina ($p < 0,0001$) em ambos os tempos, e a TM V.Qv. foi maior que ambos estes controles apenas no tempo de 24 horas ($p < 0,0001$).

A proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) é uma citocina pró-inflamatória importante no processo de infiltração leucocitária no melanoma, além de estimular a secreção de outras citocinas, como o interferon- γ (IFN- γ), IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator transformador de crescimento- β (TGF- β). Tanto sua presença, como a das citocinas subsequentes à sua ação, possuem um efeito protetor contra o crescimento tumoral no melanoma murino B16F10 *in vivo* (NAKASONE et al., 2012). As análises demonstraram que embora às 24 horas não tenha havido diferenças em relação ao não tratado em nenhum dos grupos, às 48 horas a TM V.Qv. e todas as suas ultradiluições apresentaram menor ($p < 0,0001$)

expressão de MCP-1, bem como a homeopatia de V.Av. 200CH ($p < 0,01$), semelhantes à Carboplatina ($p < 0,0001$). Comparado à esta, a TM V.Av. apresentou maior expressão de MCP-1 ($p < 0,05$) nos tempos de 24 e 48 horas; a homeopatia V.Av. 12DH teve expressão maior ($p < 0,01$) às 48 horas e as diluições de V.Qv. 12DH ($p < 0,01$) e 5LM ($p < 0,05$) foram maiores às 24 horas.

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina com efeito imunossupressor envolvida na tolerância imunológica ao melanoma. Ela suprime a imunovigilância do melanoma e promove seu crescimento, através da inibição da função dos macrófagos e indução de proliferação tumoral (GORDY et al., 2018). Estudos mostram que sua redução/neutralização, estimula os efeitos antitumorais em melanoma murino B16F10 *in vivo* (GORDY et al., 2018; MARCHI et al., 2011). Na avaliação realizada, apenas a TM V.Av. apresentou maior expressão ($p < 0,0001$) de IL-10 nos tempos de 24 e 48 horas, comparativamente às células não tratadas e à carboplatina.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória envolvida na polarização para o padrão de resposta imunológica Th-2, com o direcionamento da diferenciação de células T CD4+ produtoras de IL-4 (RINCÓN et al., 1997) e impedindo a resposta imunológica Th-1 (DODGE et al., 2003). A IL-6 está envolvida no crescimento tumoral e contribui nas vias de evasão do sistema imune pelas células tumorais. Além disso, a redução/neutralização da IL-6 promove redução do crescimento tumoral, melhora a resposta imunológica ao tumor e reduz a recorrência após remissão em melanoma murino B16F10 (CHAN et al., 2019). Neste estudo, tanto comparativamente ao grupo sem tratamento quanto à carboplatina, apenas as TMs apresentaram maior expressão de IL-6, sendo no caso da TM V.Av. nos tempos de 24 ($p < 0,0001$) e 48 horas ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$) e no caso da TM V.Qv. apenas com 24 horas ($p < 0,001$).

Com isto, vemos que as TMs embora tenham apresentado aumento da expressão de citocinas, devido sua alta toxicidade e morte por necrose, a TM V.Av. promoveu um ambiente neutro com tendência a anti-inflamatório e a TM V.Qv. promoveu ambiente menos inflamado com menos recrutamento de Macrófagos. Já as diluições homeopáticas promoveram diminuição da expressão de MCP-1 possibilitando menor recrutamento de Macrófagos e modulação do processo inflamatório.

Em relação às possíveis alterações morfológicas após os tratamentos, foi observado que as células sem tratamento apresentam características que estão em conformidade com esperado

para células neoplásicas malignas. Análises microscópicas mostraram que não houve alterações significativas na morfologia das células B16F10 após tratamento com as ultradiluições homeopáticas. Já os grupos tratados com carboplatina, após 24 horas passaram a apresentar células menores com vacuolização citoplasmática, condensação nuclear e corpos apoptóticos. Às análises dos tratamentos com as TMs no tempo de 1 hora, já é possível evidenciar restos celulares e células com citoplasma fortemente corado e de bordos indefinidos, além de imagens sugestivas de cariólise e picnose. Nos tempos seguintes apresentam ainda citoplasma vacuolizado e núcleo sem definição, semelhantes a células liquefativas.

Em paralelo, foi realizada avaliação qualitativa das figuras de mitose, onde no tempo de 1 hora, nas diluições homeopáticas da TM V.Qv., houve maior quantidade de imagens das fases iniciais da mitose (de prófase à metáfase), com células arredondas, desaparecimento da membrana nuclear e dos nucléolos e condensação da cromatina. Por outro lado, em todos os outros grupos, onde não houve morte completa, observou-se uma prevalência de imagens das fases finais da mitose (telófase, citocinese), com membrana nuclear e nucléolos presentes e descondensação da cromatina e divisão do citoplasma. Para melhor compreensão destas alterações induzidas pelos tratamentos, a avaliação quantitativa destas figuras de mitose será realizada posteriormente.

Além das alterações celulares que os tratamentos podem induzir, é importante investigar os efeitos em relação à capacidade de migração dessas células tumorais após os tratamentos. O ensaio de *Wound Healing* verifica a capacidade de migração direcional em monocamadas de culturas celulares (RODRIGUEZ; WU; GUAN, 2005). O estudo mostrou que as células B16F10 embora apresentem grande capacidade migratória quando sem tratamento, sofreram declínio desta ao serem expostas a todos os tratamentos testados neste estudo. No entanto, ainda que nenhum dos tratamentos tenha apresentado diferença significativa entre os tempos de 0 e 24 horas, é possível observar diminuição do perímetro da ferida ao longo do tempo, diferente do observado na Carboplatina.

Todas estas análises constituem um estudo sem precedentes na pesquisa com ultradiluições de VA, fornecendo dados de base para futuros estudos que possam verificar ainda mais profundamente seus mecanismos de ação, bem como abordar outras potências que ainda não tenham sido verificadas.

6 CONCLUSÃO

As TMs de *V. album* de *Abies alba* e *Quercus robur*, colhidos no verão, promoveram diminuição do metabolismo celular, morte por necrose com alta citotoxicidade e o estresse oxidativo variou dependendo da espécie, houve modulação no perfil inflamatório, alterações morfológicas significativas de sofrimento e morte celular com apenas 1 hora de tratamento, o que impossibilitou, inclusive, a análise de migração.

As diluições homeopáticas apresentaram comportamentos de modulação dos processos celulares, tanto com relação ao metabolismo, quanto com relação à sua replicação e estresse oxidativo; alterações nos padrões de inflamação, mitose e migração.

A diluição 200CH de *Quercus* de verão apresentou resultados diferentes dos outros tratamentos, tais dados isolados podem ser artefato ou não, de forma que outros estudos precisam ser realizados.

Os resultados obtidos com as ultradiluições homeopáticas de VA são inéditos e colaboram para a compreensão dos efeitos e mecanismos de ação dessas homeopatias, além de reforçarem a necessidade de outros estudos.

Tabela 3: Resultados mais relevantes obtidos em todas as análises, com os tratamentos utilizados na Fase II.

TRATAMENTOS	METABOLISMO (MTT)	VIABILIDADE (CV)	MORTE (ANEXINA-7AAD)	PRODUÇÃO DE EROS (DCFH-DA)	CITOCINAS (CBA)	MORFOLOGIA (GIEMSA)	MIGRAÇÃO (WH)
TM V.Av.	↓	↓	Necrose	↑	>IL12; >TNF; >IFN γ ; >IL10; >IL6	Morte	Morte
V.Av. 12D		↓		↓#			Inconclusivo
V.Av. 200CH		↓		↑	<MCP1		Inconclusivo
V.Av. 5LM		↓		↓#			Inconclusivo
TM V.Qv.	↓	↓	Necrose	↑	>IL12; >IFN γ ; <MCP1; >IL6	Morte	Morte
V.Qv. 12D	↓	↓		↓#	<MCP1	Possíveis alterações em mitose	Inconclusivo
V.Qv. 200CH		↓	<viabilidade; >necrose (48h)	↓#	<MCP1	Possíveis alterações em mitose	Inconclusivo
V.Qv. 5LM		↓		↓#	<MCP1	Possíveis alterações em mitose	Inconclusivo

#: diferença significativa em relação ao grupo tratado com Carboplatina.

REFERÊNCIAS

- BAGOT, J. L.; LEGRAND, A.; THEUNISSEN, I. Use of Homeopathy in Integrative Oncology in Strasbourg, France: Multi-center Cross-Sectional Descriptive Study of Patients Undergoing Cancer Treatment. **Homeopathy**, 2021.
- BÉJA, L. Avaliação in vitro do efeito de preparações homeopáticas de *Phytolacca decandra* sobre células de adenocarcinoma mamário humano. Orientadora: Elizabeth Cristina Perez Hurtado. 2020. 38f. **Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental)** - Universidade Paulista, São Paulo, 2020.
- BELLAVITE, P. et al. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. **Homeopathy**, 104(2), 139-160; 2015.
- BONAMIN, L. V.; DE CARVALHO, A. C.; WAISSE, S. Viscum album (L.) in experimental animal tumors: A meta-analysis. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 13, n. 6, p. 2723-2740, 2017.
- BONAMIN, L.; WAISSE S. Transdisciplinarity and Translationality in High Dilution Research: Signals and Images Giri Series. **Cambridge Scholars Publishing**, 2019. 290p.
- CHAN, L.-C. et al. IL-6/JAK1 pathway drives PD-L1 Y112 phosphorylation to promote cancer immune evasion. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 8, p. 3324–3338, 15 jul. 2019.
- CHEN, Z. et al. Irradiance plays a significant role in photobiomodulation of B16F10 melanoma cells by increasing reactive oxygen species and inhibiting mitochondrial function. **Biomedical Optics Express**, v. 11, n. 1, p. 27, 1 jan. 2020.
- DE CARVALHO, A. C. Atividade anti-neoplásica de viscum album (L.) em tumores experimentais: revisão crítica e estudo experimental em tumor de ehrlich. **Tese de Doutorado**. Universidade Paulista. 2015.
- DE CARVALHO, A. C.; PORTO, E.; BONAMIN, L. V. Canine neurofibrosarcoma treatment with Viscum album in serial dilutions. **International Journal of High Dilution Research.**, v. 12, n. 44, p. 106-106, 2013.

DODGE, I. L. et al. IL-6 Production by Pulmonary Dendritic Cells Impedes Th1 Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 9, p. 4457–4464, 2003.

DOS SANTOS, A. P. et al. Homeopathy in Experimental Cancer Models: A Systematic Review. **Homeopathy**, 2020.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 137–148, ago. 2004.

DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In: Advanced protocols in oxidative stress II. **Humana Press**, Totowa, NJ, 2010. p. 57-72.

FELENDÁ, J. E.; TUREK, C.; STINTZING, F. C. Antiproliferative potential from aqueous *Viscum album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and puothonin on human cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 236, p. 100-107, 2019.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. pdb. prot087379, 2016.

FLOROS, K. V. et al. mRNA expression analysis of a variety of apoptosis-related genes, including the novel gene of the BCL2-family, BCL2L12, in HL-60 leukemia cells after treatment with carboplatin and doxorubicin. **Biological Chemistry**, v. 385, n. 11, 1 jan. 2004.

FRASS, M. et al. Influence of adjunctive classical homeopathy on global health status and subjective wellbeing in cancer patients—A pragmatic randomized controlled trial. **Complementary therapies in medicine**, v. 23, n. 3, p. 309-317, 2015.

GEE, K. et al. The IL-12 Family of Cytokines in Infection, Inflammation and Autoimmune Disorders. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 40–52, 1 mar. 2009.

GORDY, J. T. et al. Anti-IL-10-mediated Enhancement of Antitumor Efficacy of a Dendritic Cell-targeting MIP3 α -gp100 Vaccine in the B16F10 Mouse Melanoma Model Is Dependent on Type I Interferons. **Journal of Immunotherapy**, v. 41, n. 4, p. 181–189, maio 2018.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167–197, ago. 2020.

HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p. 711-723, 2010.

HOLANDINO, C. et al. Phytochemical analysis and in vitro antiproliferative activity of *Viscum album* ethanolic extracts. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, 2020.

HOLANDINO, C. et al. *Viscum album* homeopathic tinctures: phytochemical profile and antiproliferative activity. **International Journal of High Dilution Research**, v. 17 (2), p. 07-08, 2018.

KALE, V. P. et al. Role of Gambogic Acid in Chemosensitization of Cancer. In: **Role of Nutraceuticals in Chemoresistance to Cancer**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 151–167.

KOCYIGIT, A.; GULER, E. M. Curcumin induce DNA damage and apoptosis through generation of reactive oxygen species and reducing mitochondrial membrane potential in melanoma cancer cells. **Cellular and Molecular Biology**, v. 63, n. 11, p. 97, 2017.

KOMEL, T. et al. Gene electrotransfer of IL-2 and IL-12 plasmids effectively eradicated murine B16.F10 melanoma. **Bioelectrochemistry**, v. 141, p. 107843, out. 2021.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095505, 2018.

LUIS, C. et al. Avoiding the interference of doxorubicin with MTT measurements on the MCF-7 breast cancer cell line. **Methods and protocols**, v. 2, n. 2, p. 29, 2019.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436–444, jul. 2008.

MARCHI, L. H. L. et al. Gene therapy with interleukin-10 receptor and interleukin-12 induces a protective interferon- γ -dependent response against B16F10-Nex2 melanoma. **Cancer Gene Therapy**, v. 18, n. 2, p. 110–122, 2011.

MATTHEWS, N. H. et al. Epidemiology of melanoma. In: **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy [Internet]**. Codon Publications, 2017.

MELO, M. N. O. et al. Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 26, n. 3, p. 311-322, 2018.

MOORE, R. J. et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. **Nature Medicine**, v. 5, n. 7, p. 828–831, 1999.

NAKASONE, Y. et al. Host-Derived MCP-1 and MIP-1 α Regulate Protective Anti-Tumor Immunity to Localized and Metastatic B16 Melanoma. **The American Journal of Pathology**, v. 180, n. 1, p. 365–374, 2012.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 2, p. 97–110, 2004.

REMYA, V.; KUTTAN, G. Homeopathic remedies with antineoplastic properties have immunomodulatory effects in experimental animals. **Homeopathy**, v.104(3), p. 211-219, 2015.

RINCÓN, M. et al. Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T Cells. p. 9, 1997.

RODRIGUEZ, Luis G.; WU, Xiaoyang; GUAN, Jun-Lin. Wound-healing assay. In: **Cell migration**. Humana Press, 2005. p. 23-29.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature reviews Disease primers**, v. 1, p. 15003, 2015.

SEKULOVIC, L. K. et al. Access to innovative medicines for metastatic melanoma worldwide: Melanoma World Society and European Association of Dermato-oncology survey in 34 countries. **European Journal of Cancer**, v. 104, p. 201-209, 2018.

SHARMA, B.; SHARMA, P. K. Homeopathy and Cancer: A Review. **Journal of Applied Dental and Medical Sciences**, v. 5, p. 1, 2019.

SONG, C. et al. PRMT1 promotes pancreatic cancer growth and predicts poor prognosis. **Cellular Oncology**, v. 43, n. 1, p. 51-62, 2019.

TAMIELLO, C. S. Efeitos da 3-nitrochalcona sobre células de hepatoma humano (HepG2). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Paraná, 2013.

UGUREL, S. et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies—update 2017. **European Journal of Cancer**, v. 83, p. 247-257, 2017.

WANG, P. et al. Reactive Oxygen Species (ROS)-Responsive Prodrugs, Probes, and Theranostic Prodrugs: Applications in the ROS-Related Diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 298–325, 2021.

ZIMMERMANN, M.; MEYER, N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. **In: Mammalian Cell Viability**. Humana Press, 2011. p. 57-63.