

## **Cellular and biochemical responses induced by Biotherapics prepared from intact influenza A (H3N2) and inactivated influenza A (H3N2) virus at 12x and 30x in the MDCK cells.**

Camila Monteiro Siqueira, Rafaela Amaral Furtado de Mendonça, Venicio Feo da Veiga, Mariah Marcondes, Patrícia Zancan, José Nelson Couceiro, Carla Holandino

Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

### **ABSTRACT**

Biotherapics are homeopathic remedies prepared from organic products that are chemically undefined and can be used for treatment of diseases like influenza. There are several classes of biotherapics and, among these, there are some called "living biotherapics" or "Roberto Costa's Biotherapics". This study aimed to compare the cellular and biochemical effects of biotherapics prepared from intact influenza virus diluted in water and the one obtained from the same viral sample inactivated by ethanol 70% (v / v), both in the potencies of 12x and 30x. Transmission electron microscopy (TEM) analyses were performed on both preparations to assess the integrity of viral particles, which showed that ethanol 70% (v/v) induced a complete denaturation of viral particles. In contrast, the integrity of virus particles was preserved when water was used as the biotherapeutic solvent. Cellular and biochemical alterations induced by the preparations on MDCK cells were analyzed and compared with those induced by respective controls (water 30x-treated and untreated cells). Cellular viability analyzed by MTT method showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in MDCK cells treated with intact biotherapeutic for 5 (3 stimuli) and 30 (18 stimuli) days in comparison with untreated control. TEM analysis did not show significant cellular changes when the different experimental groups were compared. The enzymatic activity of phosphofructokinase 1 (PFK), an important enzyme in the glycolytic pathway, presented a statistically significant increase ( $p < 0.05$ ) after 30 days of treatment when compared to control groups. The results obtained suggest that inactivation of viral sample with ethanol 70% induces lysis and disruption of viral particles. In addition, preliminary results indicated that treatment with intact biotherapeutic seems to induce higher variations on MDCK cells responses when compared to inactivated-biotherapeutic-treated cells. Further analyses are ongoing, including scanning electron microscopy and quantification of the number of mitosis, in order to elucidate the mechanisms involved with biochemical and cellular responses induced by these biotherapics.

**Keywords:** Biotherapeutic, influenza, cell alteration.

## **Respostas celulares e bioquímicas induzidas por bioterápicos preparados a partir de influenza A (H3N2) íntegro e influenza A (H3N2) inativado nas potências 12x e 30x na linhagem MDCK.**

### **RESUMO**

Bioterápicos são medicamentos homeopáticos manipulados a partir de produtos biológicos quimicamente indefinidos podendo ser utilizados para o tratamento de doenças como a gripe. Existem várias classes de bioterápicos dentre as quais os chamados “Bioterápicos vivos” ou “Bioterápicos Roberto Costa”. O presente trabalho teve como objetivo comparar os efeitos celulares e bioquímicos de bioterápicos produzidos a partir do vírus Influenza íntegro e manipulado a partir da mesma amostra viral inativada em etanol a 70% (v/v), ambos nas potências 12x e 30x. Foram feitas análises por microscopia eletrônica de ambos os medicamentos para verificar a integridade das partículas virais. Células MDCK foram tratadas por estes bioterápicos e por seus respectivos controles (água 30x e células sem tratamento) e analisadas quanto à morfologia, viabilidade e parâmetros bioquímicos. Na análise por microscopia eletrônica, foi observado que o bioterápico íntegro apresentou partículas virais íntegras enquanto que o bioterápico inativado apresentou somente fragmentos de partículas virais. As células MDCK foram tratadas durante 30 dias, num total de 18 estímulos. Nos períodos de 5, 10 e 30 dias a viabilidade celular foi analisada por MTT e sendo detectadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nas respostas celulares aos diferentes estímulos e potências, quando as células foram tratadas por 5 dias (6 estímulos) e 30 dias (18 estímulos). A análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão não foi capaz de evidenciar alterações celulares nas diferentes situações experimentais avaliadas. A atividade da enzima Fosfofrutocinase 1 (PFK), importante enzima da via glicolítica indicou um aumento estatisticamente significativo da atividade enzimática, após 5 dias de tratamento ( $p < 0,05$ ) em comparação aos grupos controle. Os resultados obtidos até o momento indicam que a inativação da amostra viral com etanol 70% induziu lise e ruptura das partículas virais. Além disso, os resultados preliminares sugerem que a resposta da linhagem MDCK ao estímulo com o bioterápico parece ser mais significativa quando as mesmas são estimuladas com o bioterápico manipulado com o vírus íntegro nas potências testadas. Outras análises estão em andamento, incluindo microscopia eletrônica de varredura e quantificação do número de mitoses, visando à elucidação dos mecanismos de ação envolvidos com as respostas bioquímicas e celulares induzidas pelos bioterápicos em estudo.

**Palavras-chave:** Bioterápico, Influenza, Alteração celular.

---

 Licensed to [GIRI](http://www.giri.org.br)

Support: CAPES

Conflict of interest: authors declare there is no conflict of interest

Correspondence author: Camila Monteiro Siqueira, [camilasiqueira2003@gmail.com](mailto:camilasiqueira2003@gmail.com).

How to cite this article: Siqueira CM, de Mendonça RAF, da Veiga VF, Marcondes M, Couceiro JN, Holandino C. Cellular and biochemical responses induced by Biotherapies prepared from intact influenza A (H3N2) and inactivated influenza A (H3N2) virus at 12x and 30x in the MDCK cells. . *Int J High Dilution Res* [online]. 2011 [cited YYYY Month dd]; 10(36): 170-171. *Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH; 2011 Sep 04-07; Foz do Iguaçu (Brazil)*. GIRI and ABFH; 2011; Available from: <http://www.feg.unesp.br/~ojs/index.php/ijhdr/article/view/497/508>