

UNIVERSIDADE PAULISTA

ANDREIA ADELAIDE GORDINHO PINTO

EFEITOS DO CLORETO DE SÓDIO 30CH NA BIO-RESILIÊNCIA DE *Artemia franciscana* AO STRESS HIPOSMÓTICO: RASTREABILIDADE E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

SÃO PAULO

2023

ANDREIA ADELAIDE GORDINHO PINTO

EFEITOS DO CLORETO DE SÓDIO 30CH NA BIO-RESILIÊNCIA DE *Artemia franciscana* AO STRESS HIPOSMÓTICO: RASTREABILIDADE E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Defesa apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin

SÃO PAULO

2023

Andreia Adelaide Gordinho Pinto

EFEITOS DO CLORETO DE SÓDIO 30CH NA BIO-RESILIÊNCIA DE *Artemia franciscana* AO STRESS HIPOSMÓTICO: RASTREABILIDADE E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista

BANCA EXAMINADORA

Aprovada em: ___/___/_____

Orientadora: Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin

Universidade Paulista - UNIP

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais amados Abel e Zulmira que sempre dedicaram suas vidas e sempre com amor me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos mais importantes da minha vida.

À minha amada irmã gêmea, minha melhor amiga e confidente Sandra A. G. Pinto, minha alma gêmea, que nunca desiste, independente e lutadora e com o maior coração do mundo, me faz ver que vale a pena seguir. Duas pessoas um só coração. Rildo obrigada por entender nossa ligação e ser um ser mais que especial.

Aos meus filhos, os meus maiores amores Lucas e ariana...minha maior força de viver... É por vocês que continuo... Me fizeram sentir o amor mais sublime e incondicional...agradeço por terem me escolhido para ser sua mamãe...e por serem os melhores filhos do mundo...

À minha família por me apoiar em meus desafios e estarem presentes na minha vida, tios e tias aos primos a amizade e carinho. Ao Dr. Willian Gonçalves Collier me pegou pela mão e mostrou o caminho das flores.

Agradeço a todos amigos e amigas, de vida, de escola de faculdade do trabalho das graduações, da UNIP, e que moram no meu coração. Mas a uma amiga mais que especial, companheira de projeto Suham que sempre me ajudou nas luas cheias e tornou meu caminho mais suave, agradeço de coração.

Aos professores e equipe da UNIP, a Prof^a. Ivana Suffredini, Prof^o. Rodrigo Augusto da Silva, a todos que dedicam sua vida a ensinar.

Em especial a minha orientadora Dra. Leoni Villano Bonamin pelo incentivo, dedicação e paciência, por transmitir sua sabedoria e todo seu conhecimento que tornou possível a realização deste estudo. Muito obrigada.

À minha amada tia Cê, minha mãe de coração, sempre me incentivou a vencer, por cada momento ao seu lado e sua alegria contagiante que estarão guardadas para sempre em meu coração. A tia Alice, vó Isaura e vô Eurico e tio Acurcio de onde estiverem vivem no meu coração eternamente (*in memoriam*).

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela bolsa PROSUP (número 88887.641641/20) concedida desde agosto de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico este volume à minha querida irmã, Sandra que me fez acreditar, lutou comigo nos dias difíceis, me fez enxergar a força que eu tinha...e a meus filhos que, sem dizerem uma única palavra...mas apenas um olhar...um sorriso...me fizeram renascer das cinzas a cada dia...

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os principais estágios de desenvolvimento de *Artemia salina*. A, Cisto, B, Fase “Guarda chuva”, C, náuplio fase instar II, D, náuplio fase instar III, E, Adulto.

Figura 2. Mecanismo de eclosão dos cistos de *Artemia salina*. Náuplios em desenvolvimento, desde o ovo até adulto de forma detalhada. (A) cisto hidratado, (B) Forma “guarda-chuva”, (C) cisto eclodindo, (D) náuplio fase instar I, (E) náuplio fase instar II, (F) náuplio fase instar III, (G) fase juvenil e (H) adulto.

Figura 3. Cistos de *Artemia salina* (A) e início de eclosão (B).

Figura 4. Ciclo de vida *Artemia salina*.

Figura 5. Fluxograma do experimento 1.

Figura 6. Fluxograma do experimento 2.

Figura 7. (A) Amostras contidas em Becker sobre o imã; (B) Exemplo de fluxo magnético.

Figura 8. Taxa de eclosão dos cistos em 24 e 48 horas de incubação. ANOVA duas vias. Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada com *Saccharomyces cerevisiae*), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base da figura. Os valores representam média e erro padrão. *Stress control* = apenas *stress* hiposmótico; *Sucussed water* = água sucussionada. N=3.

Figura 9. Razão entre estágios “guarda-chuva” e cistos em 24 e 48 horas de incubação. ANOVA de duas vias. Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada com *Saccharomyces cerevisiae*), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base da figura. Os valores representam média e erro padrão. *Stress control* = apenas *stress* hiposmótico; *Sucussed water* = água sucussionada. N=3.

Figura 10. Vitalidade naupliar, medida como razão entre o número de náuplios vivos e o número de cistos semeados após 24 e 48 horas de incubação. ANOVA de duas vias. Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada com *Saccharomyces cerevisiae*), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base da figura. Os valores representam média e erro padrão. *Stress control* = apenas *stress* hiposmótico; *Sucussed water* = água sucussionada. N=3.

Figura 11. Taxa de eclosão dos cistos em 24 horas (A) e 48 horas (B). Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base das figuras. Os valores das colunas representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. ANOVA de uma via. N=4. Nenhum *outlier* identificado.

Figura 12. Razão entre estágios “guarda-chuva” e cistos em 24 horas (A) e 48 horas (B). Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base das figuras. Os valores representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. ANOVA de uma via, seguida de Tukey. N=4. Um *outlier* identificado em 24 horas.

Figura 13. Vitalidade naupliar, medida como razão entre o número de náuplios vivos e o número de cistos semeados após 24 horas (A) e 48 horas (B) de incubação. Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base da figura. Os valores representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. ANOVA uma via seguida de Tukey. N =4. Um *outlier* identificado em 24 horas.

Figura 14. Taxa de eclosão dos cistos em 48 horas após ressemeadura em água do mar. Todos os grupos foram previamente expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. Os valores das colunas representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. Kruskal-Wallis. N=2. Nenhum *outlier* identificado.

Figura 15. Razão entre estágios “guarda-chuva” e cistos em 48 horas após ressemeadura em água do mar. Todos os grupos foram previamente expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. Os valores das colunas representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. Kruskal-Wallis. N=2. Nenhum *outlier* identificado.

Figura 16. Vitalidade naupliar, medida como razão entre o número de náuplios vivos e o número de cistos semeados após 48 horas após ressemeadura em água do mar. Todos os grupos foram previamente expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). Os dados estatísticos estão

reportados na base das figuras. Os valores das colunas representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. Kruskal-Wallis. N=2. Nenhum *outlier* identificado.

Figura 17. Expressão gênica relativa (mRNA) de *HSP26*, *p26*, *HSP40* e *HSP90*.

Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. Os valores das linhas representam média e desvio padrão, os círculos negros representam os valores individuais de cada *pool* de amostras. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. One way-ANOVA, Tukey. N=4.

Figura 18. Box-plot da interação de amostras de NaCl 30CH e controles (água, álcool 10%, sucussionados ou não) com corantes solvatocrômicos (ver tabela 2).

Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. One way-ANOVA, Tukey. N=8.

Figura 19. Box-plot da interação de amostras de água submetida a diferentes tratamentos.

Baseline refere-se ao controle não tratado e não submetido a *stress*, ou seja, água do mar artificial. Os demais grupos referem-se a amostras de água purificada sob diferentes tratamentos. Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. One way-ANOVA, Tukey. N=4.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primers* disponíveis para a identificação de HSPs de *Artemia franciscana* consideradas como marcadores de bio-resiliência. Os *primers* foram usados no ensaio de expressão de RNAm (qPCR).

Tabela 2. Corantes solvatocrômicos, características químicas e respectivas concentrações de trabalho.

Tabela 3. Taxas de eclosão de cistos e mortalidade naupliar após 48 horas de incubação em água purificada, solução fisiológica e água salina 5%, sob diferentes tratamentos com potências homeopáticas de NaCl.

Sumário

1.1. Bioresiliência e as proteínas do choque térmico	15
1.2. Epigenética e homeopatia	18
1.3. Homeopatia e isoterapia com cloreto de sódio.....	18
1.4. Modelo de <i>Artemia salina</i> e <i>Artemia franciscana</i>	19
2. Justificativa.....	23
3. Objetivos	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. Ética	24
5. Métodos.....	25
5.1. Preparação do isoterápico de NaCl.....	25
5.1.1. Preparação dos controles para o experimento.....	25
5.1.2. Codificação dos frascos	26
5.2. Eclosão de cistos de <i>A. franciscana</i>	26
5.2.1. Preparação da água salina e <i>stress</i> osmótico.....	26
5.2.2. Delineamento experimental.....	27
5.3. Determinação da expressão gênica de proteínas de choque térmico – HSPs	31
5.3.1. Extração de Ácido Ribonucleico (RNA).....	31
5.3.2. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	32
5.3.3. Análise da expressão gênica RT-PCR.....	32
5.4. Análises físico-químicas do NaCl 30CH e da água do mar pelo método dos corantes solvatocrômicos.....	33
5.4.1. Preparo das Amostras	33
5.4.2. Magnetização das amostras por imã de neodímio (2400 Gauss)	34
5.4.3. Leituras das amostras	35
5.5. Análise estatística.....	36

6. Resultados	38
6.1. Ensaio piloto	38
6.2. Experimento 1	39
6.3. Experimento 2	42
6.4. Expressão de genes para HSPs	49
6.5. Interação das amostras com corantes solvatocrômicos	49
7. Discussão.....	54
8. Conclusão	59
9. Conflito de interesses.....	59
10. Créditos	59
11. Referências	59

RESUMO

Introdução: Nesse estudo, a *Artemia franciscana* e o isoterápico de cloreto de sódio foram utilizados como modelos experimentais para avaliação da bio-resiliência de embriões ao *stress* hiposmótico, com enfoque para a possibilidade de rastreamento do isoterápico na água e a expressão de genes para proteínas de choque térmico (HSPs) como marcadores moleculares. **Objetivo:** Estudar os mecanismos de biorresiliência de *Artemia franciscana* ao *stress* hiposmótico após tratamento com cloreto de sódio (NaCl) 30CH e identificar sua presença na água pelo método de corantes solvatocrômicos. **Métodos:** Os experimentos foram realizados nas fases da lua cheia e minguante em cego. Utilizadas placas de cultura de 96 poços para observar a eclosão de cistos de *Artemia franciscana*, imersos em água pura ou água do mar artificial. Em estudo piloto foi feita a padronização do *stress* hiposmótico e a escolha da potência de NaCl entre 6CH e 200CH. Os controles foram água, água sucussionada, etanol 10% e etanol 10% sucussionado. Cistos expostos à água pura e tratados ou não com NaCl 30CH foram avaliados quanto à taxa de eclosão, vitalidade dos náuplios e expressão de genes-alvo para HSPs. Foi realizado um *screening* de 6 corantes solvatocrômicos para a seleção de um marcador físico-químico capaz de identificar a presença de NaCl 30CH na água. Dados analisados por ANOVA de duas vias, seguida de Tukey, sendo $\alpha < 0,05$. **Resultados:** O tratamento dos cistos com NaCl 30CH facilitou a interrupção da eclosão no estágio guarda-chuva e a expressão reduzida dos genes *hsp26* e *hsp90*. Os corantes BDN e *Coumarin 7* mostraram ser bons marcadores físico-químicos para o rastreamento do NaCl 30CH e *Coumarin 7* foi escolhido para sua identificação na água. **Discussão:** O fato de os cistos permanecerem em estágio "guarda-chuva" em maior proporção e a menor expressão de *p26* e *hsp90* após o tratamento com NaCl 30CH sugere facilitação dos processos de interrupção do ciclo de vida dos animais expostos a condições ambientais incompatíveis com a espécie (*stress* hiposmótico severo), com possível impacto para toda a cadeia trófica em situações de vida real. O NaCl 30CH foi possível de ser rastreado na água pelo corante *Coumarin 7*. **Conclusão:** Houve facilitação da interrupção do desenvolvimento embrionário pelo NaCl 30CH em situações de alto risco para a espécie, sendo tal potência homeopática rastreável na água por corantes solvatocrômicos.

Palavras-chave: homeopatia, diapausa, camarão das salmouras, ecotoxicologia, corantes solvatocrômicos.

ABSTRACT

Introduction: In this study, *Artemia franciscana* and sodium chloride isotherapeutic were used as experimental models to evaluate the bio-resilience of embryos to hypoosmotic stress, focusing on the possibility of tracking the isotherapeutic in water and the expression of genes for heat shock proteins (HSPs) as molecular markers. **Objective:** To study the bioresilience mechanisms of *Artemia franciscana* to hypoosmotic stress after treatment with sodium chloride (NaCl) 30CH and identify its presence in water using the solvatochromic dye method. **Methods:** The experiments were carried out in the full and waning moon phases, in blind. The 96-well culture plates were used to observe *Artemia franciscana* cysts hatching when immersed in pure water or artificial seawater. In a pilot study, NaCl 30CH was chosen from a screening of potencies between 6CH and 200CH under severe hypoosmotic stress. Controls were water, succussion water, 10% ethanol, and 10% succussion ethanol. Cysts exposed to pure water and treated or not with NaCl 30CH were evaluated for hatching rate, nauplii vitality, and expression of HSPs target genes. Six solvatochromic dyes were screened to select a physicochemical marker capable of identifying the presence of NaCl 30CH in water. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey, with $\alpha < 0.05$. **Results:** Treatment of cysts with NaCl 30CH facilitated the arrest of hatching at the umbrella stage and reduced the *hsp26* and *hsp90* gene expression. The BDN and Coumarin 7 dyes were good physicochemical markers for tracking NaCl 30CH, and Coumarin 7 was chosen to track it in water. **Discussion:** The fact that the cysts remain in the "umbrella" stage in a greater proportion and the lower expression of *p26* and *hsp90* after treatment with NaCl 30CH suggests facilitation of interrupting the life cycle process in animals exposed to environmental conditions incompatible with the species (severe hypoosmotic stress), with possible impact on the entire trophic chain in real-life situations. NaCl 30CH was able to be traced in water by the dye Coumarin 7. **Conclusion:** The interruption of embryonic development was facilitated by NaCl 30CH in situations of high risk for the species, with such homeopathic potency being traceable in water by solvatochromic dyes.

Keywords: homeopathy, diapause, brine shrimp, ecotoxicology, solvatochromic dyes.

1. Introdução

1.1. Bioresiliência e as proteínas do choque térmico

O meio ambiente retém impactos irreversíveis cometidos pela conduta humana, promovendo assim extermínio do seu ecossistema, isto ocorre pelo excesso de superpopulação, extração dos meios naturais, destruição e desmatamento, causando problemas irreparáveis, como a perturbação da biodiversidade e o aquecimento do planeta [1 - 6]. Por outro lado, o uso de produtos homeopáticos em reservatórios de água para promoção de bioresiliência em ecossistemas específicos tem sido reportado na literatura [7 - 9]. Por conseguinte, a homeopatia aplicada à água tem sido vista como um agente promotor de sustentabilidade no que se diz respeito à preservação ambiental [10].

Buscar conhecimento das especificidades físicas da água [11] pode ser um caminho possível para mitigar esse processo [12], com base em tecnologias sustentáveis e inovadoras, tais como altas diluições de substâncias ativas submetidas a agitação vigorosa e repetida relacionadas às alterações nas propriedades dielétricas da água [13, 14].

Paralelamente, algumas espécies de animais aquáticos têm sido utilizadas como bioindicadores de toxicidade [15], em especial microcrustáceos como aqueles do gênero *Artemia* (ou artêmias). Embriões de *Artemia salina* destinados à diapausa (estado de latência do embrião dentro do cisto) sintetizam quantidades variáveis de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) ou HSPs, no sentido de facilitar o processo de adaptação da espécie ao *stress* ambiental [16]. Assim sendo, tais HSPs podem ser consideradas marcadores moleculares de bioresiliência. As HSPs controlam o intervalo espontâneo da diapausa e fornece proteção contra o *stress* para embriões encistados [17]. Mukherjee *et al.*, em 2013, elaboraram um estudo em que *Thuja 30CH* reduziu os efeitos nocivos ao DNA provocados pela exposição ao benzopireno. Em associação, houve menor expressão de HSP90 [18].

Vários estudos tem sido feitos para mensurar a resiliência utilizando diferentes técnicas, inclusive aquelas em que se utiliza inteligência artificial e análises multifatoriais [19 - 22]. Contudo, o modelo da eclosão de cistos de microcrustáceos associado ao processo de diapausa tem mostrado ser um

modelo experimental simples e eficiente para o estudo da bioresiliência [23]. Adicionalmente, o gênero *Artemia* é um eficiente bioacumulador na cadeia alimentar marinha, capaz de transportar toxinas para as restantes camadas tróficas [24], o que o faz um ótimo modelo para o estudo de recursos capazes de mitigar o impacto ambiental de agentes tóxicos.

Segundo os autores Rowarth e MacRae, em 2018, após a submissão de artemias a choque térmico observou-se a síntese de ArHSP40-2, indicando sua participação na resistência dos embriões e de náuplios (estágio larval de *Artemia* sp) ao *stress*. Bioquimicamente, a HSP ArHSP40-2 auxilia no resgate de proteínas sequestradas durante a diapausa via p26, uma chaperona importante nessa fase do desenvolvimento de *Artemia* sp., por permitir sua sobrevivência em condições de *stress* extremo [25]. As diferenças de quantidade e localização de HSPs explicam por que os embriões designados a cistos que eventualmente entram na diapausa sintetizam p26, ArHSP21 e ArHSP22, enquanto embriões destinados a náuplio não produzem tais chaperonas. Tais estudos - realizados *in vivo* - mostram que a redução de uma pequena proteína de choque térmico diminui igualmente o desenvolvimento de embriões destinados à diapausa, sugerindo o papel da p26 no processo de desenvolvimento [26 - 28]. Entende-se por chaperonas (ou “damas de companhia moleculares”) proteínas cuja função é proteger outras proteínas da desnaturação frente a diferentes tipos de *stress*, pois dispõem da habilidade de se relacionar com outras proteínas contribuindo na criação, dobramento e deslocamento das mesmas [29, 30].

A HSP26 é uma chaperona modulada também pela temperatura, com capacidade de organizar amplos complexos oligoméricos, os quais se dissociam em função da temperatura, sendo esse um pré-requisito para seu funcionamento efetivo. Considera-se que a expressão de HSP26 e p26 seja um dos mecanismos de maior contribuição para a adaptação de embriões de *Artemia franciscana* em diapausa quando expostos a ambientes desfavoráveis [31].

A proteína de choque térmico 90 (HSP90), outra chaperona, auxilia na maturação e estabilização de proteínas e no controle de qualidade de proteínas mal dobradas. A ação da HSP90 sobre outras proteínas é essencial para o controle e prevenção de várias doenças como o câncer, mal de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, ou infecções virais e bacterianas [32].

Portanto, a indução da síntese de HSP90 pode ser uma estratégia interessante para o tratamento de neoplasias e outras doenças [33].

Em mamíferos, a família de proteínas HSP90 corresponde a um aglomerado de moléculas altamente conservadas na escala filogenética, que estão envolvidas em uma infinidade de processos celulares. A sua distribuição ocorre em vários compartimentos intracelulares, o que é essencial para a homeostase, pois garante a viabilidade e controle do ciclo celular, além de regular a sinalização hormonal e a apoptose [33]. Em tecidos funcionalmente defeituosos, a morte celular programada (apoptose) é um dos mecanismos fundamentais regulados mediados por HSP90, os quais incluem apoptose, autofagia, e outras formas de morte celular [34].

HSPs como a HSP70 e HSP90 também desempenham funções importantes na identificação de antígenos, estimulam a atividade de linfócitos, macrófagos, facilitam a maturação de células dendríticas apresentadoras de antígenos (APCs) e regulam a imunidade inata [35 - 38]. A HSP70, por sua vez, coopera com outros sistemas de chaperonas celulares, incluindo HSP90, HSP60 ou chaperoninas, pequenas proteínas de choque térmico, HSP100 e o fator de choque térmico 1 (HSF 1), constituindo uma rede dinâmica eficiente e reversível para regular processos que envolvem dobramento, desenvolvimento, regulação, direcionamento, agregação e desagregação e degradação de várias outras proteínas [39 - 41].

A HSP40 é considerada um biomarcador de exposição ao *stress*, cujos efeitos permitem a regulação do comportamento de natação e dos mecanismos de defesa celular de *Artemia franciscana* [42]. A HSP22 é produzida em embriões em diapausa podendo exercer função tanto nas respostas de *stress* de curto prazo, quanto na proteção à degradação proteica durante esse período [43]. A artemina é um tipo de proteína homóloga à ferritina com funções específicas para diapausa e possui atividade como chaperona. A diminuição da artemina reduz a tolerância à dessecação e ao congelamento de cistos, o que demonstra a propriedade dessa proteína de promover resistência ao *stress* [44].

1.2. Epigenética e homeopatia

Em 2019, Teixeira propôs uma correlação conceitual entre perfis de evolução de doenças segundo critérios homeopáticos (miasmas crônicos) e alterações epigenéticas promotoras de doenças [45]. Tal correlação justificaria o uso de auto-sarcódio de DNA como modulador terapêutico homeopático da expressão gênica para o manejo e controle de doenças crônicas.

Dados experimentais mostram, em diferentes situações, que medicamentos homeopáticos de naturezas diferentes podem modificar o padrão de expressão gênica, ou seja, a combinação de genes que são expressos e de genes que são suprimidos, frente ao tratamento de células com diferentes potências homeopáticas *in vitro*, resultando na modulação das funções celulares de forma concatenada [46 - 49]. Contudo, a demonstração dos mecanismos epigenéticos envolvidos nesses processos tem sido pouco relatada. Um exemplo é um estudo publicado em 2013 em que o medicamento ultradiluído *Condurango* 30C foi capaz de interromper o ciclo celular em células HeLa de câncer cervical, desencadeando regulação epigenética pela modulação da atividade da enzima histona-deacetilase 2 [50]. Siqueira (2018) explica que a deacetilação de histonas é um processo de regulação epigenética relacionada ao silenciamento do fator gênico, ocasionado a condensação mais intensa da cromatina em razão da eliminação de grupos acetil por essa enzima [51].

1.3. Homeopatia e isoterapia com cloreto de sódio

A homeopatia foi estabelecida em 1796 por Samuel Hahnemann, um médico alemão. Hahnemann disserta a respeito das características farmacológicas de vários preparados medicamentosos empregados na época. E demonstra os resultados obtidos com medicamentos preparados com inúmeros compostos orgânicos e inorgânicos, no que diz respeito aos efeitos secundários do organismo, em resposta aos estímulos primários manifestos pela própria doença [52].

O tratamento homeopático constitui-se em administrar ao doente diluições sucussionadas de uma substância capaz de causar, em indivíduos saudáveis, sintomas idênticos aos demonstrados pelo indivíduo doente [53, 54], os quais são descritos como “patogenesia” do medicamento. Assim, a homeopatia utiliza

a ideia da “cura pela similitude”. As doses infinitesimais de preparados medicamentosos são extremamente fracionadas e diluídas, impostas a agitações vigorosas e ritmadas e, nesse processo, têm capacidade de preservar a expressão da substância de origem no próprio solvente, permitindo os resultados biologicamente específicos. Embora ainda não se conheça exatamente os mecanismos de preservação da informação medicamentosa, os produtos homeopáticos têm amplo potencial de utilização tanto em pacientes humanos quanto em animais, sejam os vertebrados ou invertebrados, além de vegetais, células isoladas e microrganismos. A terapia homeopática foi reconhecida como especialização no Brasil pelo Conselho Federal de Medicina em 1980 e pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária em 1997 [55 - 65].

Recentemente, uma série de estudos utilizando *Artemia sp* revelaram resultados instigantes em relação à facilidade de adaptação dessa espécie a algumas substâncias tóxicas após o tratamento com isoterápicos na água [65]. No presente estudo, utilizou-se o modelo de *Artemia franciscana* descrito por Mohammad (2023), neste caso foram estudados os resultados das três potências de isoterápico (6CH, 30CH, 200CH) de saxitoxinas provenientes de cianobactérias sobre a taxa de eclosão de cistos e expressão de genes para HSPs [66].

1.4. Modelo de *Artemia salina* e *Artemia franciscana*

O camarão de salmoura é um crustáceo aquático pertencente ao gênero *Artemia*, ordem *Anostraca*, filo *Arthropoda*. São microcrustáceos braquiópodes, muito usados em ensaios de toxicidade [67, 68]. São achados especialmente em águas salgadas, sua alimentação é baseada em algas, bactérias, unicelulares, minúsculos protozoários e alguns resíduos desfeitos no meio [69]. A *Artemia sp.* são espécies cosmopolitas, ou seja, muito conhecidas por se adaptarem a vários ambientes. São parte da dieta de peixes e têm alto teor em proteínas, vitaminas e sais minerais [70].

O corpo de *Artemia sp* é subdividido em três partes: cabeça, tórax e abdome. A cabeça tem dois olhos pedunculados, um olho náuplio, antênulas filiformes e antenas. Os cistos de *Artemia sp* variam de 0,45 mm de comprimento e 0,1 mm de largura. O náuplio (larva) o diâmetro de 0,2 a 0,3 mm. O ciclo de

vida é de 21 dias. A *Artemia* sp possui de 5 a 6 mm e, na fase adulta, e chega a 15 a 16 mm. A fêmea será ovípara ou ovovípara depende das circunstâncias ambientais, tendo como exemplo a alta salinidade [71]. Após a eclosão do cisto e o nascimento da larva (náuplio), tem-se o desenvolvimento em 5 etapas até se desenvolver completamente (adulto) [72, 73] (**Figuras 1 a 4**). A *Artemia* sp. pode ter reprodução sexuada ou assexuada, gerando em torno de 300 ovos ou náuplios a cada 4 dias [74].

A artêmia tem sido aplicada em experimentos de toxicidade por sua habilidade em permitir que seus cistos entrem em diapausa, condição essa em que o metabolismo dos cistos continua fisiologicamente suprimido, gerando assim uma eficiente resistência a vários fatores nocivos do meio externo, além de ser fácil de se manusear e cultivar [75]. Dessa forma, são seres extremamente bioresilientes, isto é, com grande capacidade de adaptação às variações ambientais. Isto ocorre devido à capacidade dos embriões de permanecerem no estado de diapausa, mantendo os cistos viáveis mesmo na presença de estímulos danosos. A menor taxa de eclosão associada à maior taxa de vitalidade dos náuplios são, portanto, um indício de adaptação e bio-resiliência desses organismos nessa fase do seu desenvolvimento [28, 66].

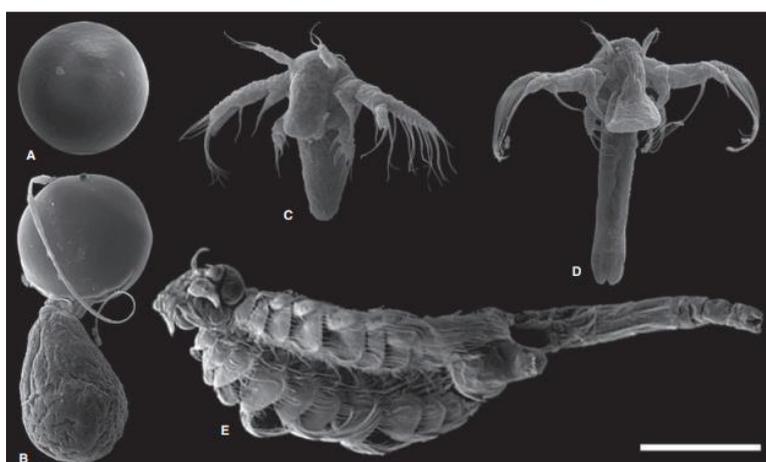


Figura 1. Os principais estágios de desenvolvimento de *Artemia salina*. A, Cisto, B, Fase “Guarda chuva”, C, náuplio fase instar II, D, náuplio fase instar III, E, Adulto. **Fonte:** Gostling *et al.*, 2009 [76].



Figura 2. Mecanismo de eclosão dos cistos de *Artemia salina*. Náuplios em desenvolvimento, desde o ovo até adulto de forma detalhada. (A) cisto hidratado, (B) Forma “guarda-chuva”, (C) cisto eclodindo, (D) náuplio fase instar I, (E) náuplio fase instar II, (F) náuplio fase instar III, (G) fase juvenil e (H) adulto. Fonte: <http://www.zootecniadomestica.com/artemia-salina/> Acesso: 25/10/2023.

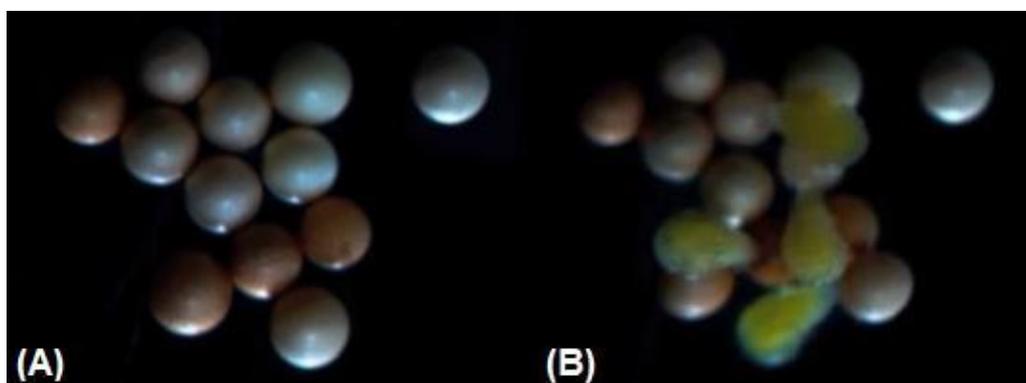


Figura 3. Cistos de *Artemia salina* (A) e início de eclosão (B). Fonte: Christensen, 2012 [77].



Figura 4. Ciclo de vida *Artemia salina*. Fonte: <http://jpets-blog.blogspot.com/2014/08/artemia-de-agua-doce-branchonetas.html>. Acesso: 25/10/2023.

No presente estudo, investigaremos possíveis variações na capacidade de bio-resiliência de *Artemia franciscana* utilizando o modelo de stress hiposmótico, definido a partir de ensaio piloto para testar de concentrações crescentes de NaCl, no intuito de observar o processo de bio-resiliência de embriões de *Artemia franciscana* sob o efeito de preparações homeopáticas (nesse caso, isopáticas) de NaCl em diferentes potências ou diluições centesimais, preparadas de acordo com a Farmacopéia Homeopática Brasileira – FHB, 3ª Edição [78].

1.5. O modelo dos corantes solvatocrômicos

Os corantes solvatocrômicos são sensíveis a uma série de estímulos ambientais e condições, incluindo polaridade do solvente, níveis de ligações de hidrogênio e mudanças nas intensidades do campo elétrico ambiente. De acordo com as descobertas de Steven Cartwright, diferentes corantes solvatocrômicos respondem às potências homeopáticas de acordo com o grau de excitação e momento de dipolo, portanto, a detecção seletiva e a identificação de diferentes potências homeopáticas é possível [79-82]. Neste modelo, as amostras

selecionadas são colocadas adicionalmente a uma quantidade pré-determinada de diversos corantes solvatocrômicos (Tabela 2) e a absorvência das amostras é quantificada através de um espectrofotômetro. A partir dos resultados obtidos, é possível selecionar qual dos corantes foi mais sensível na detecção das preparações homeopáticas, o que traz o caráter de rastreabilidade para o corante em questão [79 - 82].

Tal interação é ainda mais perceptível ao submeter as amostras a um campo magnético. Um estudo feito por Mohammad *et al.*, em 2023, mostrou que a interatividade dos corantes com as amostras foi muito mais clara e específica ao submeter as mesmas a um campo magnético forte e unidirecional [66].

2. Justificativa

No estudo anterior foram avaliados efeitos de isoterápicos na intoxicação de *Artemia franciscana* por cloreto de mercúrio na concentração efetiva 10%, sendo observada redução transitória da taxa de eclosão e melhor adaptação dos náuplios a esse ambiente. Tal resultado motivou o desenvolvimento de novos modelos e ferramentas de estudo para a compreensão dos mecanismos de bio-resiliência envolvidos, que justifiquem os efeitos de preparações homeopáticas nesses casos.

Assim, o possível efeito do tratamento de cistos submetidos a *stress* hiposmótico com isoterápico de cloreto de sódio em potências seriadas foi registrado por meio de parâmetros biológicos, especialmente aqueles relacionados aos mecanismos epigenéticos de bio-resiliência, associados à síntese de proteínas do choque térmico (HSPs) e às variações do momento dipolo da água trata, detectada pelo método dos corantes solvatocrômicos.

A correspondência entre o processo de bio-resiliência ao *stress* osmótico e mudanças físico-químicas da água após inserção de diluições homeopáticas de cloreto de sódio também podem fornecer elementos importantes na elucidação dos mecanismos de ação das preparações homeopáticas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Estudo dos efeitos de potências homeopáticas de cloreto de sódio, adicionadas na água do mar, sobre a eclosão de cistos, a vitalidade de náuplios e a expressão de genes para proteínas de choque térmico (HSPs) de *Artemia franciscana*, bem como a identificação de mudanças físico-químicas da água após a adição das potências homeopáticas, no intuito de se estabelecer um marcador físico-químico capaz de rastrear sua presença.

3.2. Objetivos específicos

- Executar um rastreamento (estudo piloto) sobre a taxa de eclosão e a vitalidade de náuplios de *Artemia franciscana* exposta a *stress* osmótico após tratamento com cloreto de sódio 6CH, 12CH, 18CH, 30CH, 60CH, 90CH, 120CH, 150CH e 200CH, a fim de escolher a potência capaz de produzir os resultados mais evidentes sobre a bio-resiliência.
- Avaliar a taxa de eclosão, a vitalidade naupliar e a expressão de genes-alvo relacionados a proteínas de choque térmico (HSPs) em embriões e náuplios tratados ou não com a potência homeopática de NaCl escolhida.
- Avaliar a interação entre a água do mar tratada com a potência escolhida e diferentes corantes solvatocrômicos, a fim de identificar o melhor marcador físico-químico com potencial para rastrear a presença deste homeopático na água.

4. Ética

O atual experimento não emprega o uso de animais vertebrados. Em conformidade a Legislação Nacional (CONCEA) e a Legislação Internacional (*EU Directive 2010/63/EU for animal experiments*), não é necessária a aprovação do projeto por comissão de ética.

5. Métodos

5.1. Preparação do isoterápico de NaCl

As matrizes (potências homeopáticas de estoque) das preparações homeopáticas foram produzidas a partir de NaCl P.A. (SIGMA-ALDRICH, Cotia, BRASIL), CAS 7647-14-5, em farmácia credenciada na ANVISA para esse fim, de acordo com o procedimento previsto pela Farmacopeia Homeopática Brasileira, 3ª edição [78] e pela Portaria N° 52, de 15 de março de 2021, do Ministério da Agricultura [84]. As matrizes foram elaboradas em álcool de cereal 10% (HN CRISTIANO, São Paulo, Brasil) para conservação em estoque. Uma potência anterior à potência de trabalho foi usada como matriz.

O preparo das potências de trabalho foi feito pela diluição 1:100 das matrizes em água purificada por osmose reversa (auferido em sistema de purificação Direct-Q3, com SmartPak Direct Q3 e filtros Biopak, MERCK – MILLIPORE, Darmstadt, Alemanha) e filtrada em filtro de malha 0.22 micrômetros (MILLIPORE, Burlington, USA). As potências finais foram 6CH, 12CH, 18CH, 30CH, 60CH, 90CH, 120CH, 150CH e 200CH, obtidas após sucussão das diluições finais em braço mecânico (Denise, AUTIC, São Paulo, Brasil). As potências de trabalho foram preparadas na véspera do experimento, no próprio laboratório de pesquisa.

A redução da concentração de álcool em 1000 vezes (diluição 1:100 de preparações feitas a 10%) evita a atividade inespecífica do solvente sobre o material biológico em análise. Ao multiplicar o fator de diluição dos medicamentos prontos na água do mar (10%), obtém-se uma concentração final de álcool igual a 1:10.000 (10^{-4}), a qual os cistos foram expostos. Tal concentração não gera efeitos biológicos diretos sobre *Artemia sp.* [23].

5.1.1. Preparação dos controles para o experimento

Os controles foram preparados com água pura estéril submetida a 100 sucussões em braço mecânico (Denise, AUTIC, São Paulo, Brasil), para análise de prováveis resultados inespecíficos de nano ou microbolhas gerados durante a sucussão seriada do líquido.

Um grupo adicional de cistos isentos de qualquer tratamento e mantidos em água do mar artificial (*baseline*) e outro grupo de cistos submetidos a *stress* sem tratamento (*controle stress*) também foram incluídos nas análises.

Todos os processos de preparação e manuseio dos tratamentos foram feitos em fluxo laminar.

5.1.2. Codificação dos frascos

Todos os frascos dos medicamentos foram codificados antes do início do experimento por um funcionário não envolvido com o experimento. Assim, todos os ensaios foram realizados em cego. As identificações originais foram trocadas e devidamente guardadas em envelope lacrado até o final do ensaio, para a execução da análise estatística posterior à revelação.

5.2. Eclosão de cistos de *A. franciscana*

No presente estudo utilizou-se cistos de *Artemia franciscana* (Maramarpet, Arraial do Cabo, Brazil). A metodologia empregada para a análise da eclosão dos cistos foi feita conforme estudos anteriores [23, 66, 86].

5.2.1. Preparação da água salina e *stress* osmótico

Um experimento preliminar (piloto) foi executado inicialmente para definição da concentração salina ideal para a produção de *stress* osmótico suficiente para estimular o processo de bio-resiliência sem produzir 100% de letalidade. O preparo de água marinha artificial foi feito em diferentes graus de salinidade, incluindo a concentração ideal 3%, equivalente à concentração da água do mar (1 litro de água destilada adicionado 30 g de sal marinho). Em todos os experimentos foram realizadas replicatas experimentais e o valor de N indica o total de repetições (unidades experimentais). As concentrações testadas foram:

- 1) **STRESS HIPEROSMÓTICO:** Solução hipertônica de NaCl (5%) – 50 g sal marinho / 1 L água purificada estéril;
- 2) **STESS HIPOSMÓTICO INTENSO - 1:** apenas água purificada estéril;
- 3) **STRESS HIPOSMÓTICO MODERADO - 2:** solução fisiológica (0,9%) estéril, de uso hospitalar;

- 4) **BASELINE (CONTROLE SEM DESAFIO):** água do mar artificial (3%) – 30 g sal marinho / 1 L água purificada estéril.

5.2.2. Delineamento experimental

Esse estudo não é um estudo patogênico, mas sim um estudo sobre a bioresiliência das artemias previamente desafiadas e os efeitos das preparações homeopáticas sobre esse processo.

O **ensaio piloto** foi desenhado em microplacas de 96 poços para avaliar os efeitos de cada potência homeopática de NaCl (de 6CH a 200CH, conforme definido no item 5.1) sobre as taxas de eclosão (número de cistos eclodidos / número total de cistos) e mortalidade naupliar (número de náuplios mortos / número total de cistos), frente aos diferentes graus de salinidade da água. Foram realizadas duas séries experimentais, cada uma em octuplicata. A unidade experimental foi definida como sendo a somatória de cistos e náuplios de 10 poços dispostos em sequência. Cada poço continha um volume de 250 µL de água salina, incluindo o volume dos tratamentos, correspondente a 10% do volume total por poço. A distribuição dos cistos foi de 9 a 20 por poço, totalizando 4173 cistos analisados. Todas as placas foram mantidas em gaiola de Faraday provida de iluminação constante com lâmpadas LED para permitir a eclosão dos cistos em 48 horas sem eventuais oscilações eletromagnéticas provenientes do ambiente (sala exclusiva fechada, mantida com iluminação artificial). O campo magnético no interior da gaiola foi constante, com intensidade de 0.06 µT (50Hz - Smart-Sensor Intel Instruments AS 1392, Singapore), o suficiente para permitir a ação das potências homeopáticas sobre os sistemas biológicos avaliados [85]. A temperatura e a umidade da sala foram registradas em 48 horas, sendo a média de 24,1 °C (desvio padrão = 0,37) e 63% (desvio padrão = 7,44), respectivamente.

A partir dos resultados obtidos no ensaio piloto (**Tabela 3**), foi escolhida a potência 30CH como a mais adequada para estudar possíveis efeitos de modulação da diapausa frente ao *stress* hiposmótico, incluindo outros parâmetros além da eclosão em si, tais como: vitalidade dos náuplios, expressão gênica para HSPs, rastreamento de seis corantes solvatocrômicos para identificação do melhor marcador para o NaCl 30CH e verificação de possível rastreabilidade do NaCl 30CH em amostras de água.

Para as demais séries experimentais, outro cuidado a ser tomado foi a padronização das fases da lua para a execução dos experimentos, uma vez que, em estudos anteriores, observou-se que a eclosão de cistos de *Artemia sp* é facilitada nas fases de lua cheia e minguante. As diferenças entre os tratamentos se mostraram mais evidentes nesse período [86, 87].

No **experimento 1** foram elaboradas quatro placas (cada placa consistiu em uma unidade experimental), sendo o total de doze placas de 96 poços distribuídas em três repetições (12, 13 e 14 de setembro de 2022). Dessa forma, N=3. Todas as repetições foram realizadas nas fases de lua cheia e minguante. Foram analisados aproximadamente 11.500 cistos ao total. Os grupos experimentais foram:

- 1) **Grupo NaCl 30CH** = 225 µL de água purificada estéril com 5% de levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) + 25 µL de NaCl 30CH;
- 2) **Grupo água sucussionada** = 225 µL de água purificada estéril com 5% de levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) + 25 µL de água sucussionada estéril (do mesmo lote usado na passagem NaCl 29 CH para NaCl 30CH);
- 3) **Grupo Baseline** (controle não desafiado - sem *stress* e não tratado) = 250 µL água do mar (3% de salinidade) com 5% de levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*);
- 4) **Grupo Stress hiposmótico** = 250 µL água purificada estéril com 5% de levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*).

Em cada poço, foram depositados cinco a dez cistos de *Artemia franciscana*. As placas, depois de preparadas, foram colocadas em uma gaiola de Faraday com isolamento total de campo magnético exterior dotada de iluminação interna por 300 lâmpadas de micro-led, a fim de promover a eclosão dos cistos, por ser um evento dependente de luz. A iluminação interna também produziu um campo magnético constante de muito baixa intensidade (0.06 µT, 50 Hz, Smart-Sensor Intel Instruments, AS 1392, Singapore) no interior da gaiola, o suficiente para permitir a atividade adequada das preparações homeopáticas [85].

Os poços foram analisados um a um, 24 e 48 horas após a imersão dos cistos na água e adição dos tratamentos, por meio de lupa digital (Microscópio

Digital C/ Zoom 1000x R Câmera 2.0 Mega Pixels USB 6 Leds, Beijing, China), acoplada a um computador. As imagens foram capturadas pelo programa AMCAP (Beijing, China). Constaram nos registros a quantidade de náuplios em estágio guarda-chuva, náuplios vivos, náuplios mortos e total de cistos. O fluxograma do experimento 1 pode ser observado na **Figura 5**.

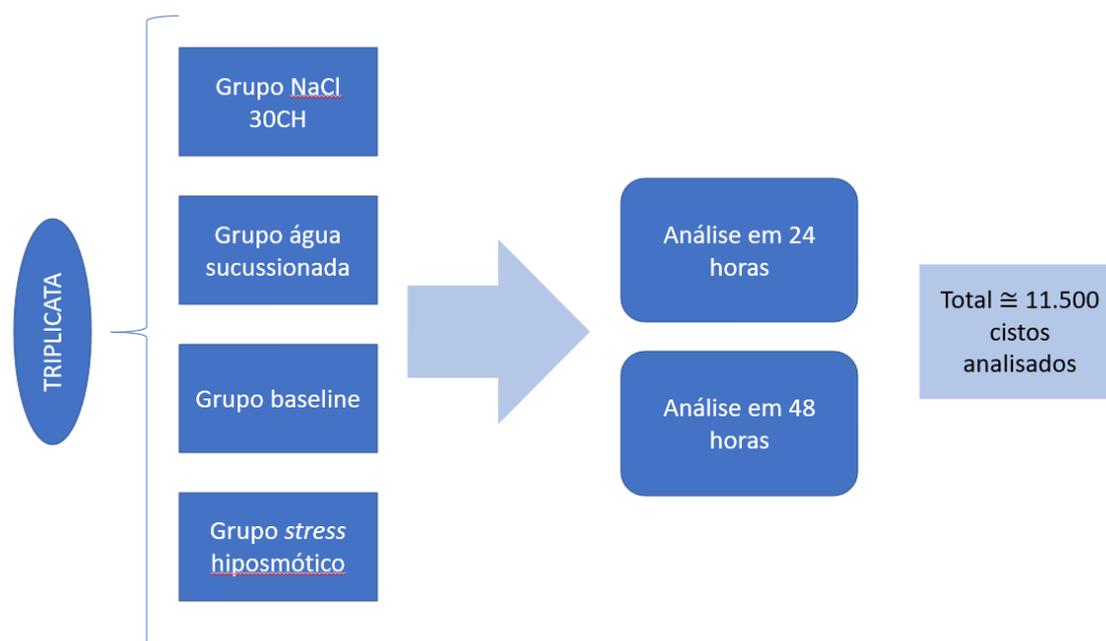


Figura 5. Fluxograma do experimento 1. Fonte: Pinto, 2023.

O **experimento 2** foi conduzido da mesma forma que o anterior, sendo cada placa uma unidade experimental, porém com um procedimento adicional: foram realizadas em 4 séries experimentais, uma placa por tratamento / série, logo, N=4 (10, 11, 12 e 13 de outubro de 2022). As duas primeiras séries (10 e 11 de outubro de 2022, N=2) passaram por novo repique de cistos após 48 horas de observação, de forma que os cistos não eclodidos fossem transferidos para outra placa com água do mar, para verificação da reversibilidade do processo de diapausa. Nesta etapa foram analisados aproximadamente 7.680 cistos.

Assim sendo, nos dias 12 e 13 de outubro, as duas placas de cada tratamento semeadas nos dias 10 e 11 de outubro foram esvaziadas com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL e todo o conteúdo foi recolhido dos 96 poços de cada placa e transferido para um tubo Falcon de 15 mL, somando ao

final, 2 mL em cada tubo. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1500 rpm para a deposição dos cistos no fundo do tubo. O sobrenadante contendo eventuais náuplios vivos e nadantes foi separado e os cistos do sedimento foram removidos delicadamente com uma pipeta de 100 μL ajustada para 50 μL e transferidos para microtubos. O volume de cada microtubo foi então ajustado para 1 mL de água do mar artificial. De cada microtubo, foram transferidos 100 μL para cada poço de uma nova placa de 96 poços, sendo preenchidos 10 poços a partir de cada microtubo, tomando-se o cuidado de agitá-lo constantemente para permitir a homogeneização dos cistos no momento da ressemeadura. O volume de cada poço foi ajustado para 250 μL , com a adição de 150 μL de água do mar artificial. A água remanescente dos tubos Falcon foi congelada para posterior análise físico-química, utilizando o método dos corantes solvatocrômicos. Ambas as placas ressemeadas (N=2) foram incubadas por mais 24 e 48 horas em temperatura ambiente, na gaiola de Faraday, para que nova leitura fosse feita a fim de se registrar a taxa de eclosão. O material remanescente dessas placas foi descartado após todas as observações.

A **Figura 6** mostra o fluxograma do experimento 2.

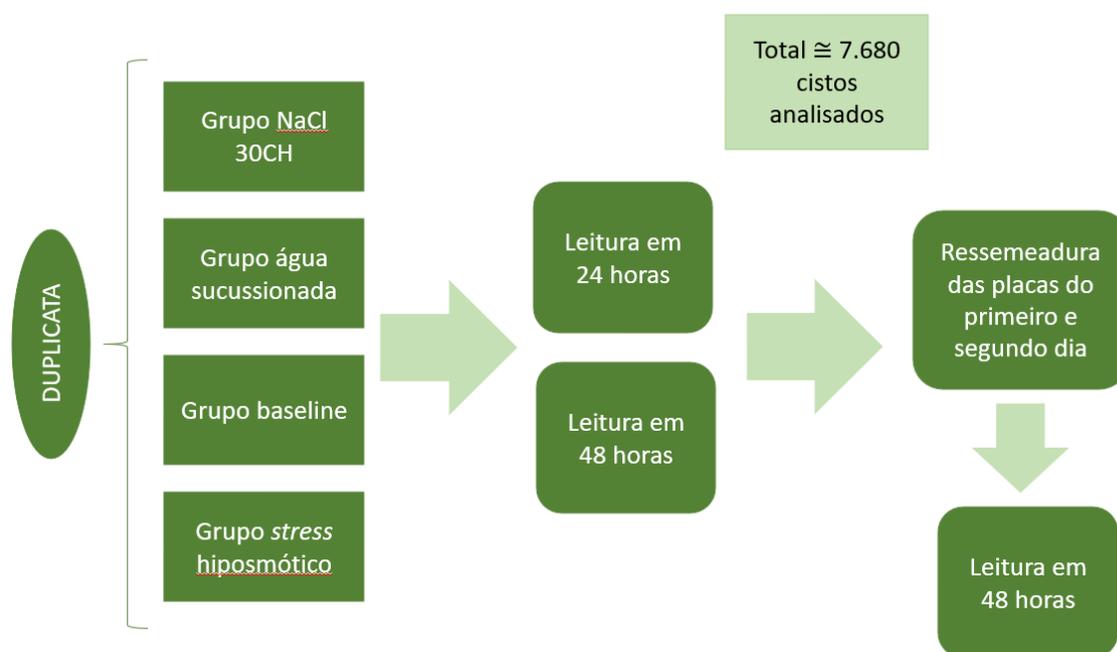


Figura 6. Fluxograma do experimento 2. Fonte: Pinto, 2023.

As placas semeadas nos dias 12 e 13 de outubro (N=2 por tratamento) foram congeladas após a leitura dos poços em 48 horas e não passaram pelo procedimento de ressemeadura. Deste material congelado, o sedimento com material biológico foi encaminhado à análise da expressão de genes para HSPs e o sobrenadante foi encaminhado para análise físico-química pelo método dos corantes solvatocrômicos, após seu descongelamento.

A fim de evitar interferências nas análises posteriores (expressão gênica e físico-química), nenhum alimento (*Saccharomyces cerevisiae*) foi inserido na água ao longo do experimento 2. As análises foram realizadas no máximo em 48 horas, período em que os náuplios utilizam suas reservas vitelínicas para sua sobrevivência.

5.3. Determinação da expressão gênica de proteínas de choque térmico – HSPs

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, identificou-se a necessidade de se realizar um estudo aprofundado sobre o processo de biorresiliência. Assim, o ensaio de expressão gênica de proteínas de choque térmico (HSPs) sabidamente envolvidas no processo de diapausa também foi executado.

As amostras biológicas recolhidas das placas usadas no experimento 2, nos dias 12 e 13 de setembro de 2022, foram utilizadas neste ensaio. Um *pool* contendo todo o material biológico de cada placa experimental foi preparado para cada tratamento (N=2 *pools*), a fim de se recolher quantidade suficiente de DNA e RNA para permitir as análises.

5.3.1. Extração de Ácido Ribonucleico (RNA)

O RNA total foi extraído após prévia homogeneização das amostras em 0,5 mL do reagente TRIzol® e adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), seguido por centrifugação refrigerada (14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C). Ao término da centrifugação a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) e transferida para tubos novos devidamente identificados, sendo desprezada a fase precipitada. Como etapa seguinte, a precipitação do RNA foi realizada pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto

gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) e incubação a temperatura ambiente por dez minutos. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (pellet) foi lavado com etanol 75% e então ressuspensionado em 20 mL de água ultrapura. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience) e armazenados a -80°C .

5.3.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000ng de RNA total previamente extraído na presença de 1U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 mL contendo 500 mM de dNTP, 25 mg/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 mM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida as amostras foram incubadas durante 50 minutos a 50°C com posterior inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído a concentração final de 100 ng/ μL e armazenado a -20°C .

5.3.3. Análise da expressão gênica RT-PCR

Para o estudo do padrão de expressão gênica as reações foram realizadas com iniciadores específicos (tabela 1) e tiveram como controle endógeno os genes At, Ef1 α e α -tubulin. Todas as reações tiveram volume final de 10 mL; contendo 5 mL de SYBR Green I Master, 0,4 mM de iniciadores específicos, 1 mL do cDNA sintetizado e q.s.p. de água ultrapura. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo foi subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em uma média do ΔCt dos genes endógenos. Para o cálculo da expressão substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à expressão gênica do gene utilizado como normalizador. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 2

experimentos independentes (placas/séries) realizados em duplicata técnica (N=4) e normalizados em relação ao controle (atribuído valor 1) para avaliação do efeito dos tratamentos.

A sequência dos *primers* (EXXTEND, Paulínia, Brasil) e as condições da PCR estão expressas na **Tabela 1**.

Tabela 1. *Primers* disponíveis para a identificação de genes para HSPs de *Artemia franciscana* consideradas como marcadores de bio-resiliência. Os *primers* foram usados no ensaio de expressão de RNAm (qPCR).

Gene	Primer	5'- 3' Sequence	Reactions Condition
ART_Hsp26	Forward	CGG AGG ATT TGG TGG TAT GAC	95°C - 15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	CCT CAA GGA CCC AGG AGT AG	
ART_Hsp40	Forward	GTG CAT CAG TTG AGC GTC AC	95°C - 15s; 59°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	TGCTGAACCATCCAGGAGC	
ART_Hsp90	Forward	GGT GTG GGT TTC TAT TCT GC	95°C - 15s; 59°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	GCA GCA GAT TCC CAC ACA	
ART_p26	Forward	GCG CGG ATC CAC CAT GGC ACT TAA CCC ATG	95°C - 15s; 57°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	CGC GCC TCG AGT TAA GCT GCA CCT CCT GTC T	
ART_At	Forward	GCA GTG GTC TAC AAG GTT TC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	ATC AAA ACG AAG GCT GGC GGT G	
ART_Ef1 α	Forward	TCG ACA AGA GAA CCA TTG AAA A	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	ACG CTC AGC TTT AAG TTT GTC C	
ART_ α -tubulin	Forward	CTG CAT GCT GTA CAG AGG AGA TGT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	CTC CTT CAA GAG AGT CCA TGC CAA	

5.4. Análises físico-químicas do NaCl 30CH e da água do mar pelo método dos corantes solvatocrômicos

5.4.1. Preparo das Amostras

As amostras de NaCl 30CH foram preparadas em fluxo laminar, segundo protocolo previamente estabelecido para o preparo de medicamentos homeopáticos [23]. No preparo utilizou-se 100 μ L da diluição matriz (29 CH) devidamente filtrada em filtro de malha 0.22 micrômetros (MILLIPORE, Burlington, USA), cujo volume foi completado para 10 mL etanol 10% de mesma origem (HN CRISTIANO, São Paulo, Brasil), igualmente filtrado. Os controles utilizados foram: água purificada estéril, água purificada estéril sucussionada cem vezes em braço mecânico (Denise, AUTIC, São Paulo, Brasil), etanol 10% (HN CRISTIANO, São Paulo, Brasil) e etanol 10% de mesma origem

sucussionado em braço mecânico. Todas as amostras dos controles também foram filtradas em filtro de malha 0.22 micrômetros (MILLIPORE, Burlington, USA).

As amostras de água do mar provenientes do experimento 2 foram filtradas e preparadas da mesma maneira.

5.4.2. Magnetização das amostras por ímã de neodímio (2400 Gauss)

Considerando os resultados recentes obtidos por Cartwright em 2020 e Mohammad em 2023 [81, 86], em que foram apresentadas evidências da natureza eletromagnética da interação corante/potência e maior sensibilidade do método quando da magnetização prévia das amostras, os testes com corantes solvatocrômicos foram realizados segundo metodologia descrita por Mohammad, 2023. Assim, após submeter as amostras a um campo magnético estático e unidirecional por 15 minutos, utilizando um ímã de neodímio modelo N42 – NdFeB (Magnetum Produtos Magnéticos, São Paulo, Brasil), medindo 5,08 x 5,08 x 1,27 cm, em formato de bloco de 270 g, revestido com níquel, cuja capacidade é de 2400 Gauss, segundo informações do fabricante (**Figura 7A**).

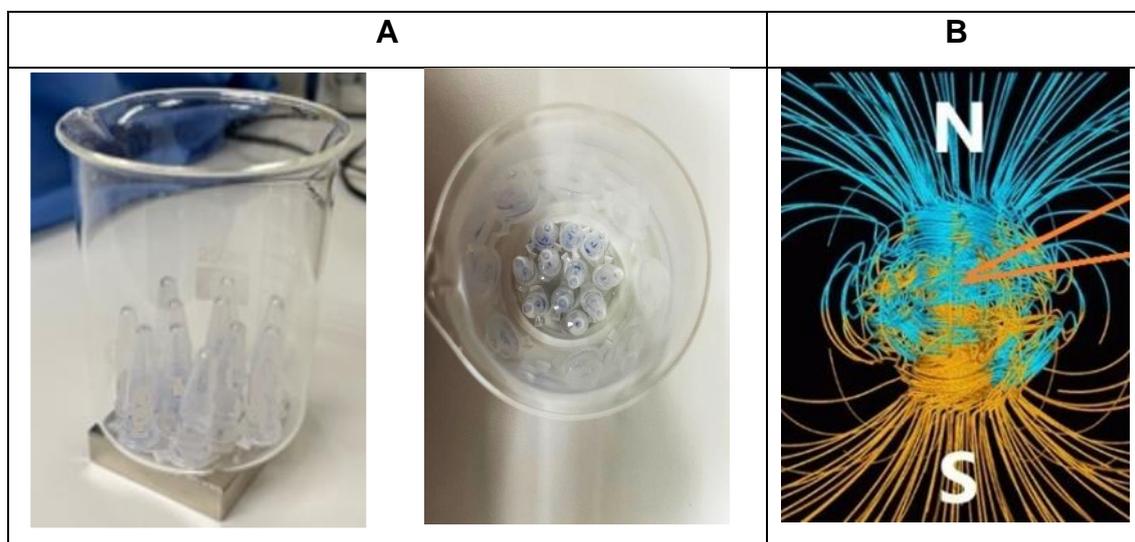


Figura 7. (A) Amostras contidas em Becker sobre o ímã; (B) Exemplo de fluxo magnético. Fontes: Bonamin, 2023 (A) e Wikimedia Commons (B).

Todas as amostras de cada experimento foram submetidas simultaneamente ao campo magnético. Os microtubos contendo cada amostra foram colocados no fundo de um Becker e posicionados sobre a face *norte* do imã, no mesmo sentido do fluxo magnético (**Figura 7B**). O imã foi colocado em uma bancada livre de equipamentos ligados à corrente elétrica para evitar interferências e telefones celulares foram mantidos a pelo menos 2 metros de distância.

5.4.3. Leituras das amostras

Os corantes usados foram preparados no dia anterior à leitura (para sua estabilização), pesando-se o pó bruto de cada corante em balança analítica e diluindo-se em álcool absoluto na concentração e volume estipulados previamente [12]. No dia seguinte, no fluxo laminar, previamente ligado e limpo, cada corante a ser utilizado foi filtrado em filtro de malha de 0.22 micrômetros (Merck–Millipore, Darmstadt, Germany), passando para uma proveta graduada de acordo com o volume calculado. O volume na proveta foi corrigido, completando com álcool absoluto (Synth, Diadema, Brasil) para compensar eventuais perdas por evaporação durante o processamento. Todo o conteúdo foi transferido para tubos Falcon estéreis bem encapados em papel alumínio, uma vez que os corantes são sensíveis à luz e guardados no refrigerador. Os corantes usados foram: *Coumarin 7*, *Nile red*, *N,N-dimethylindoaniline* (NN-DMIA), *4-(bis-(4-(dimethylamine) phenyl methylene)-1(4H)-naphthalenone* (BDN), *dimethylamino-benzylidene-rhodanine* (RODANINA) e *Methylene violet*. A caracterização química de cada corante está descrita na **Tabela 2**.

Para a leitura das amostras foi determinado o pico de absorvância de cada corante testado. Para isso, utilizou-se um espectrofotômetro (FEMTO 800 XI®, São Paulo, Brasil) com sensibilidade de 1 nanômetro, sendo as amostras lidas e cubetas acrílicas descartáveis de 1,5mL. Todo o espectro de luz visível foi utilizado, em um procedimento de varredura entre 350 e 800 nm, descontada a absorvância do solvente puro (etanol P.A., Synth, Diadema, Brasil). O procedimento foi feito o mais rapidamente possível, para evitar a degradação do corante pela exposição à luz. As bandejas com cubetas foram cobertas com papel alumínio até o momento da leitura.

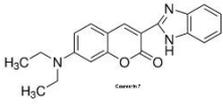
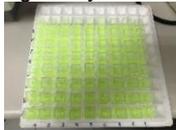
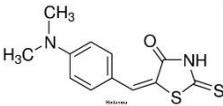
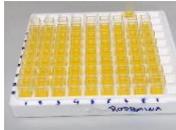
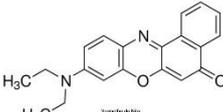
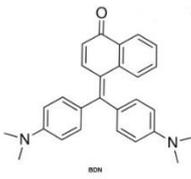
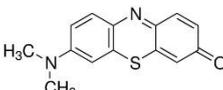
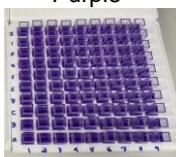
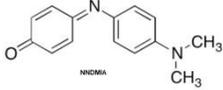
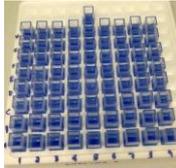
Uma vez definido cada comprimento de onda correspondente ao pico de absorvância de cada corante, todas as amostras de NaCl 30CH e de água do mar, bem como de seus respectivos controles, foram lidas em leitor de ELISA (EPOCH – Agilent BioTek, Santa Clara, CA, USA), utilizando cada comprimento de onda previamente determinado. Para isso, em microplacas de 96 poços de fundo chato, as amostras foram adicionadas aos corantes em poços contendo 240 μL , igualmente respeitando a proporção 1:60 (236 μL de corante mais 4 μL de cada amostra). Para as amostras de NaCl 30CH e respectivos controles foram utilizados 8 poços (N=8). Para as amostras de água - referente ao *pool* de um mesmo tratamento experimental – foram utilizados quatro poços (N=4).

Em cada placa utilizada, uma fileira de 8 poços foi preenchida apenas com 240 μL de álcool absoluto (etanol P.A., Synth, Diadema, Brasil), para determinação da absorvância média do solvente puro, e uma fileira de oito poços foi preenchida com 240 μL de corante puro, para a determinação da absorvância média do corante no momento exato da leitura. Os dados foram gerados e identificados automaticamente em uma planilha Excel a cada leitura. As análises estatísticas foram feitas a partir do *delta* de cada amostra, ou seja, absorvância de cada amostra já descontada da absorvância do solvente menos a absorvância média do respectivo corante puro, também descontada a absorvância do solvente.

5.5. Análise estatística

A análise estatística e os gráficos foram feitos usando *GraphPad Prism* versão 10.0 para Windows. ANOVA de duas vias seguida de Tukey foram os testes usados para avaliação global da eclosão dos cistos em função do tempo, no experimento 1. Nos demais experimentos, os parâmetros que se mostraram mais significativos foram avaliados detalhadamente, em 24 e 48 horas. Dessa forma, a normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e pela inspeção dos gráficos quartil-quartil (gráficos Q-Q). ANOVA de uma via avaliou variáveis normais para identificar significância estatística entre tratamentos. O pós-teste de Tukey foi utilizado para comparação entre os grupos. *Outliers* foram identificados seguindo a regra de Tukey usando a ferramenta box-plot do *software* e removidos, se necessário. O nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$.

Tabela 2. Corantes solvatocrômicos, características químicas e respectivas concentrações de trabalho. **Fonte:** Mohammad 2023 [86].

Corante	Fórmula química	Cor em etanol absoluto	Concentração de trabalho
<p>COUMARIN 7 3-(2-BENZIMIDAZOLYL)-7-(DIETHYLAMINO)COUMARIN CAS Number 27425-55-4 C₂₀H₁₉N₃O₂</p>	 <p>(https://www.sigmaaldrich.com/B R/pt/product/aldrich/416541)</p>	<p>Fluorescent green/yellow</p> 	25 µM
<p>RHODANINE 5-(4-DIMETHYLAMINO)BENZYLIDENE) RHODANINE CAS Number: 536-17-4 C₁₂H₁₂N₂OS₂</p>	 <p>(https://www.sigmaaldrich.com/B R/pt/product/aldrich/114588)</p>	<p>Yellow</p> 	50 µM
<p>NILE RED NILE BLUE A OXAZONE CAS Number: 7385-67-3 C₂₀H₁₈N₂O₂</p>	 <p>(https://www.sigmaaldrich.com/B R/pt/product/sigma/19123)</p>	<p>Pink</p> 	20 µM
<p>BDN (+) 4-(BIS-(4-(DIMETHYLAMINE) PHENIL) METHYLENE) - 1(4H) - NAFTALENONE CAS Number: not available C₂₇H₂₆N₂O</p>	 <p>(https://www.sigmaaldrich.com/B R/pt/product/sigma/19123)</p>	<p>Purple/deep blue</p> 	80 µM
<p>VM METHYLENE VIOLET (BERNTHSEN) CAS Number: 2516-05-4 C₁₄H₁₂N₂OS</p>	 <p>(https://www.sigmaaldrich.com/B R/pt/product/aldrich/s873705)</p>	<p>Purple</p> 	50 µM
<p>N, N-DIMETHYLINDOANILINE (NN-DMIA) 4-[[4-(Dimethylamine) phenyl] luminol]-2,5-cyclohexadien-1-one CAS Number: 2150-58-5 C₁₄H₁₄N₂O</p>	 <p>(https://www.sigmaaldrich.com/B R/pt/product/sial/216313)</p>	<p>Blue</p> 	25 µM

6. Resultados

6.1. Ensaio piloto

O modelo de *stress* escolhido para os experimentos subsequentes foi o *stress* hiposmótico intenso (1- água purificada estéril), cujos resultados mostraram clara diferença entre taxas de eclosão e de mortalidade naupliar entre os tratamentos testados. Os resultados obtidos na condição *stress* hiposmótico moderado (2- solução NaCl 0,9%) mostraram diferenças menos marcantes entre os tratamentos. Houve 100% de mortalidade dos náuplios nascidos em solução hipertônica (3- água salina 5%).

Portanto, a análise descritiva dos dados mostrou menor taxa de eclosão e mortalidade nas amostras tratadas com NaCl 30CH submetidas a *stress* hiposmótico intenso (água purificada) (**Tabela 3**). Por esse motivo, tal condição e tratamento foram escolhidos como modelo para a execução dos experimentos subsequentes.

Tabela 3. Taxas de eclosão de cistos e mortalidade naupliar após 48 horas de incubação em água purificada, solução fisiológica e água salina 5%, sob diferentes tratamentos com potências homeopáticas de NaCl.

Stress hiposmótico 1 - água purificada												
	no stress	stress										
NaCl	Baseline	cont. stress	água suc	6CH	12CH	18CH	30CH	60CH	90CH	120CH	150CH	200CH
Taxa de eclosão	73,15%	54,07%	73,04%	65,83%	75,91%	60,09%	50,00%	52,58%	60,63%	71,84%	66,90%	78,74%
Taxa de mortalidade	0,00%	28,89%	25,22%	21,67%	30,66%	22,07%	19,57%	25,77%	26,25%	34,95%	31,72%	37,01%

Stress hiposmótico 2 - solução fisiológica - NaCl 0,9												
	no stress	stress										
NaCl	Baseline	cont. stress	água suc	6CH	12CH	18CH	30CH	60CH	90CH	120CH	150CH	200CH
Taxa de eclosão	65,22%	63,24%	66,95%	68,42%	74,66%	61,90%	54,17%	53,85%	73,20%	66,04%	57,83%	61,95%
Taxa de mortalidade	0,00%	19,85%	23,73%	27,63%	19,18%	23,81%	20,00%	18,46%	21,65%	17,92%	21,69%	19,47%

Stress hiperosmótico - água salina 5%												
	no stress	stress										
NaCl	Baseline	cont. stress	água suc	6CH	12CH	18CH	30CH	60CH	90CH	120CH	150CH	200CH
Taxa de eclosão	81,82%	61,67%	68,57%	64,71%	80,45%	65,82%	67,74%	77,78%	74,79%	71,43%	72,73%	73,33%
Taxa de mortalidade	0,00%	61,67%	68,57%	64,71%	80,45%	65,82%	67,74%	77,78%	74,79%	71,43%	72,73%	73,33%

6.2. Experimento 1

A avaliação da eclosão dos cistos sob *stress* hiposmótico intenso (água purificada com alimento (*Saccharomyces cerevisiae*) e tratamento com NaCl 30CH foi feita por ANOVA de duas vias, em comparação aos respectivos controles (*baseline* ou controle sem desafio, *stress* hiposmótico apenas e *stress* hiposmótico e tratamento com água sucussionada). A análise mostrou que quase a totalidade dos nascimentos ocorreu em 48 horas, com diferença estatística entre os tempos 24 e 48 horas [$F(1, 16) = 184.4, p < 0.0001$], mas não entre os tratamentos. Da mesma forma, não houve interação estatística entre tempo e tratamento (**Figura 8**).

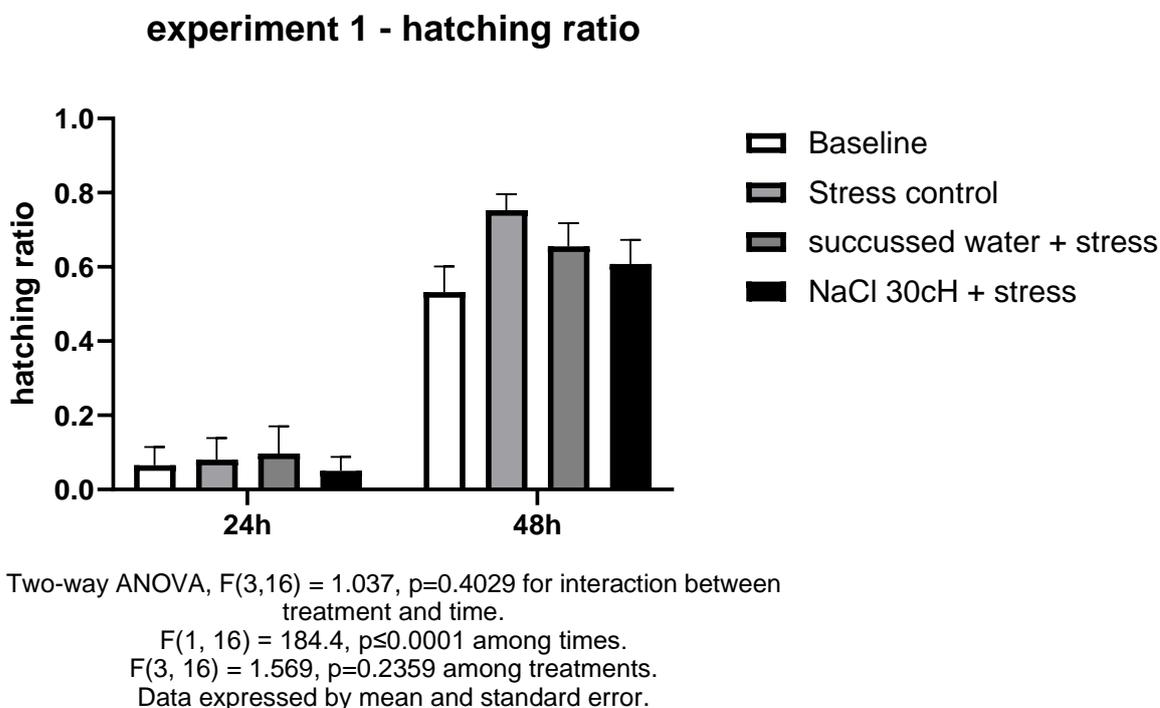


Figura 8. Taxa de eclosão dos cistos em 24 e 48 horas de incubação. ANOVA duas vias. Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada com *Saccharomyces cerevisiae*), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base da figura. Os valores representam média e erro padrão. *Stress control* = apenas *stress* hiposmótico; *Succussed water* = água sucussionada. Foram feitas três replicatas experimentais com N=11.500 cistos.

Para melhor compreender o processo de eclosão entre os diferentes tratamentos em função do tempo, a razão entre cada estágio naupliar e o número de cistos inicial por placa foi também calculado. Na **Figura 9**, observa-se a proporção entre o número de cistos em estágio inicial de eclosão (estágio “guarda-chuva”). Não há significância estatística na interação tempo – tratamento, nem entre os tratamentos em 24 horas e em 48 horas isoladamente. Contudo, há certa tendência do grupo tratado com NaCl 30CH em atrasar o aparecimento de cistos eclodidos em estágio “guarda-chuva”.

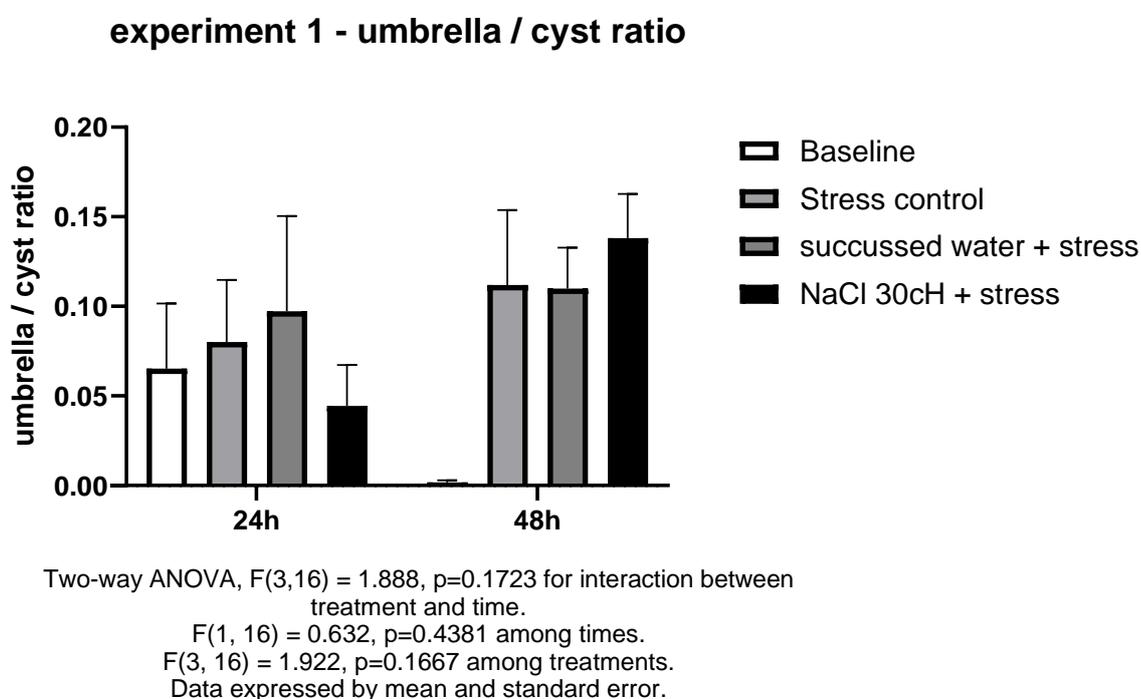


Figura 9. Razão entre estágios “guarda-chuva” e cistos em 24 e 48 horas de incubação. ANOVA de duas vias. Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada com *Saccharomyces cerevisiae*), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base da figura. Os valores representam média e erro padrão. *Stress control* = apenas *stress* hiposmótico; *Succussed water* = água sucussionada. N=3.

No que diz respeito a “vitalidade” dos náuplios nascidos (número de náuplios vivos / número de cistos semeados), observa-se que os nascimentos ocorreram quase que totalmente após 48 horas de incubação. Há redução significativa da vitalidade nos grupos submetidos a *stress* [$F(3, 16) = 21,44$, $p=0,0001$] em relação ao grupo controle *baseline*, não submetido a *stress* (**Figura 10**). Face a essas observações, nota-se interação estatística entre tempo e tratamento [$F(3, 16) = 21,87$, $p=0,0001$] e diferença estatisticamente significativa entre 24 e 48 horas [$F(1, 16) = 85,33$, $p=0,0001$].

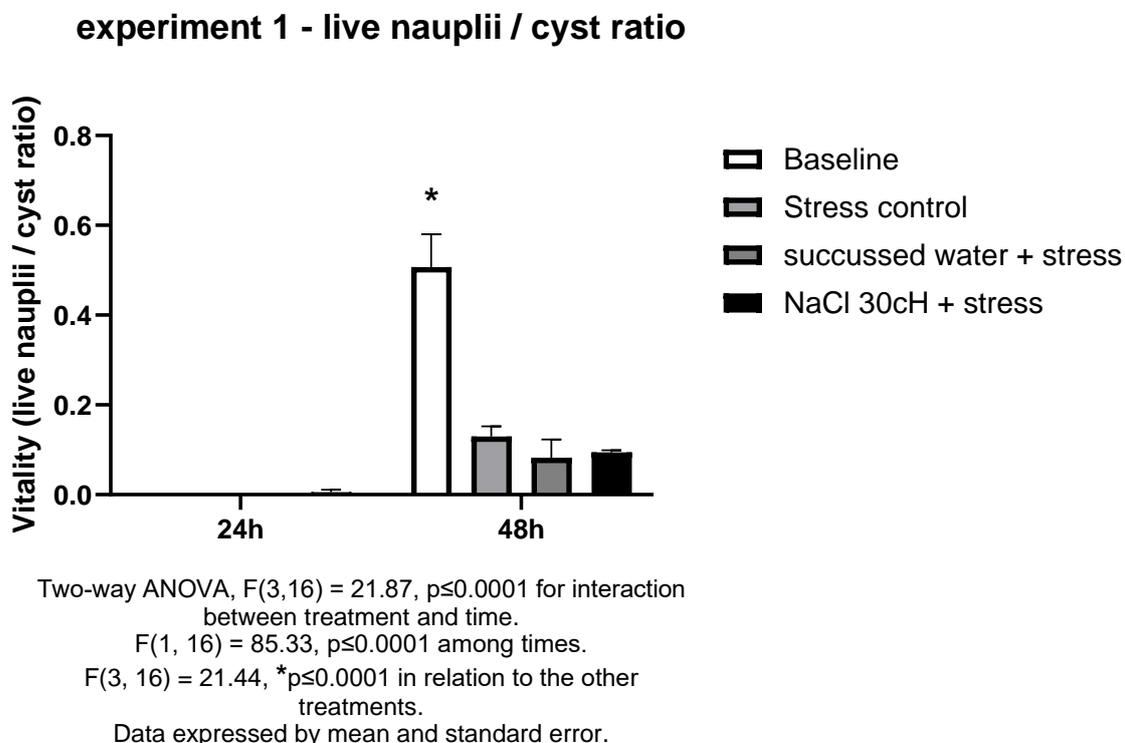


Figura 10. Vitalidade naupliar, medida como razão entre o número de náuplios vivos e o número de cistos semeados após 24 e 48 horas de incubação. ANOVA de duas vias. Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada com *Saccharomyces cerevisiae*), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base da figura. Os valores representam média e erro padrão. *Stress control* = apenas *stress* hiposmótico; *Succussed water* = água sucussionada. N=3.

6.3. Experimento 2

A repetição do experimento com novo protocolo (sem adição de alimento) em duas séries de duplicatas (para avaliação em 24 e 48 horas, N=4) e duas séries de duplicatas (com repique em água do mar por mais 48 horas, N=4) revelou dados adicionais não perceptíveis no primeiro experimento.

A taxa de eclosão dos cistos não mostrou diferença estatística entre os grupos, nem em 24 horas, nem em 48 horas, embora se perceba uma tendência de eclosão precoce nos grupos tratados com água sucussionada e NaCl 30CH (**Figura 11**). A mesma tendência foi notada na proporção entre cistos em estágio “guarda-chuva” e o total de cistos semeados após 24 horas. Mas as diferenças estatisticamente significantes foram observadas após 48 horas, em que a retenção de cistos em estágio “guarda-chuva” foi proporcional aos tratamentos recebidos, tendo uma porcentagem mais expressiva no grupo tratado com NaCl 30CH (**Figura 12**). Contudo, a quantidade de náuplios vivos em relação ao total de cistos semeados foi de praticamente zero em 48 horas, ou seja, houve 100% de letalidade nos grupos submetidos a *stress*. Tal efeito era esperado dada a agressividade do estímulo *stressante* para a espécie (água em 0% de salinidade). O grupo baseline mostrou proporções esperadas de náuplios vivos em 48 horas (**Figura 13**).

Os cistos mantidos por 48 horas sob *stress* hiposmótico intenso (água purificada) e ressemeados por mais 48 horas em água do mar mostraram taxa de eclosão e vitalidade comparável aos parâmetros medidos após 48 horas sob *stress*, o que mostra a não reversibilidade da inibição da eclosão mesmo após a transferência para um ambiente favorável. Tal resultado sugere ter havido a morte dos embriões após o *stress* sofrido, independentemente do tratamento aplicado (**Figuras 14, 15 e 16**). A variância do grupo baseline (não desafiado) mostra que o próprio repique é, *per se*, um fator *stressante*, contudo, os resultados são claramente distintos dos grupos expostos previamente ao *stress* hiposmótico prévio.

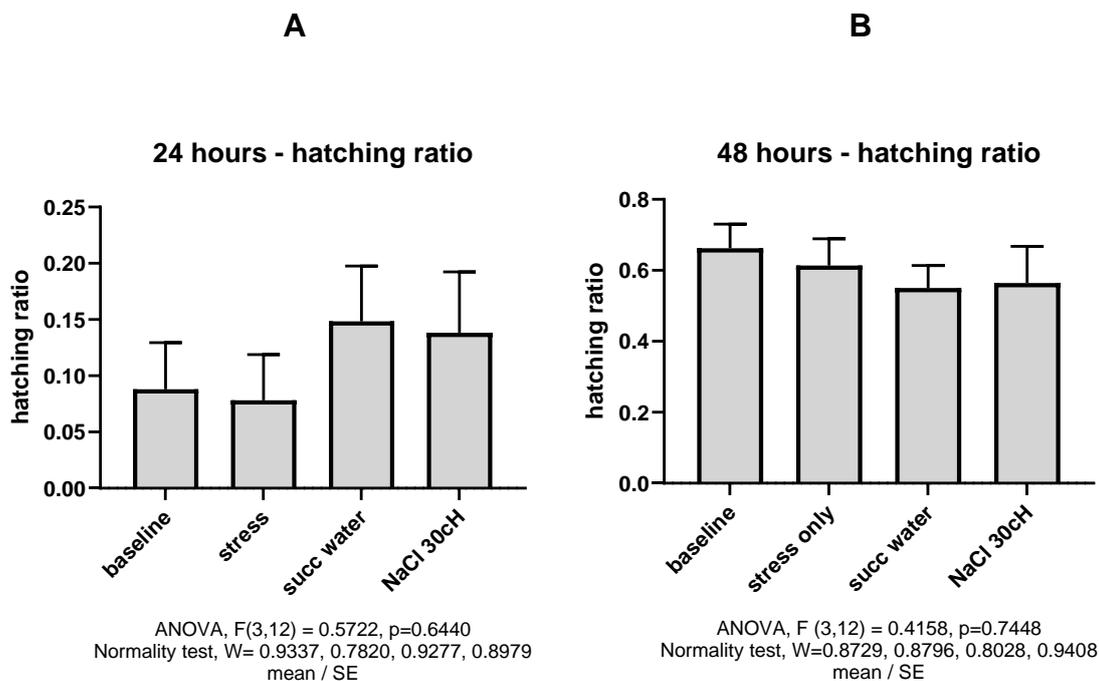


Figura 11. Taxa de eclosão dos cistos em 24 horas (A) e 48 horas (B). Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base das figuras. Os valores das colunas representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. ANOVA de uma via. N=4. Nenhum *outlier* identificado.

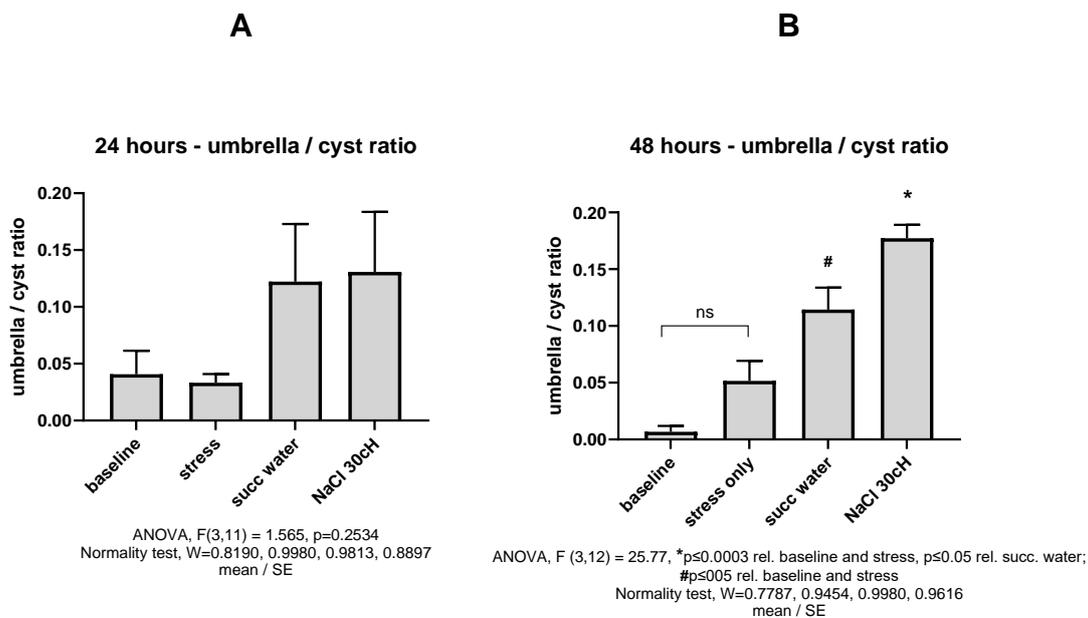


Figura 12. Razão entre estágios “guarda-chuva” e cistos em 24 horas (A) e 48 horas (B). Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base das figuras. Os valores representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água succussionada. ANOVA de uma via, seguida de Tukey. N=4. Um *outlier* identificado em 24 horas.

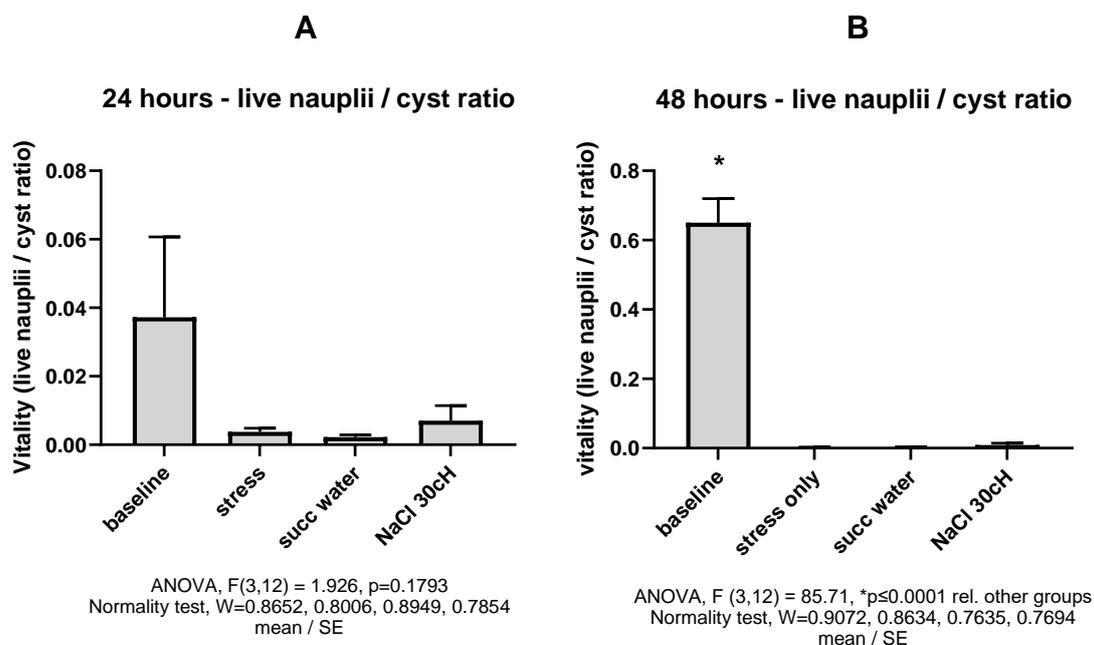


Figura 13. Vitalidade naupliar, medida como razão entre o número de náuplios vivos e o número de cistos semeados após 24 horas (A) e 48 horas (B) de incubação. Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). As significâncias estatísticas entre tempo e tratamento estão reportadas na base da figura. Os valores representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. ANOVA uma via seguida de Tukey. $N = 4$. Um *outlier* identificado em 24 horas.

re-seeding 48 hours - hatching ratio

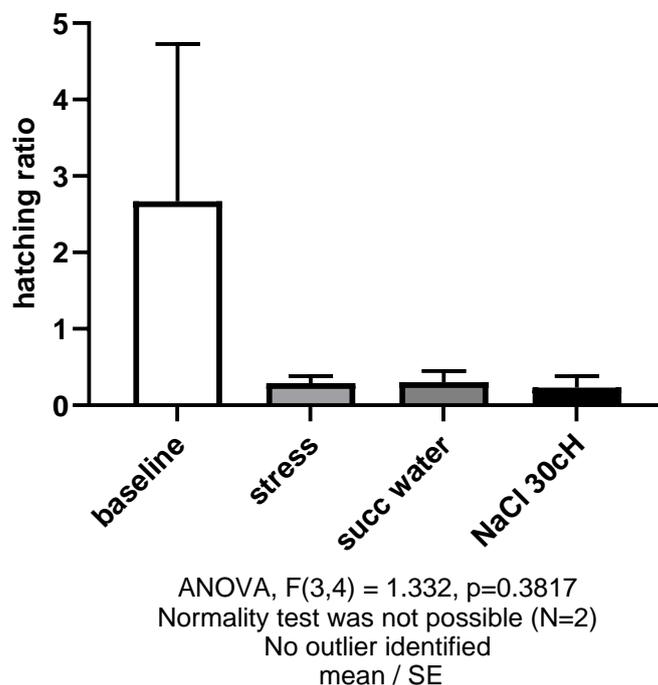


Figura 14. Taxa de eclosão dos cistos em 48 horas após ressemeadura em água do mar. Todos os grupos foram previamente expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. Os valores das colunas representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. ANOVA de uma via. Não foi possível a verificação da normalidade. N=2. Nenhum *outlier* identificado.

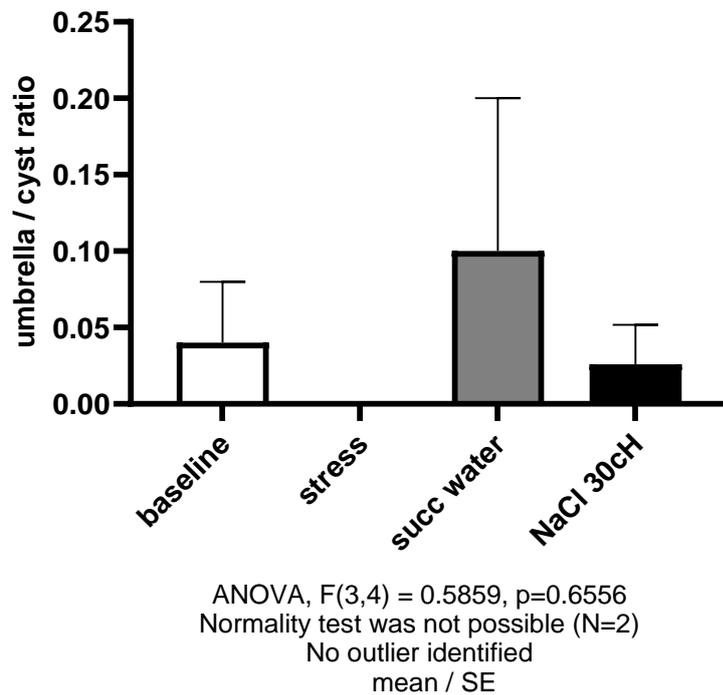
re-seeding 48 hours - umbrella / cyst ratio

Figura 15. Razão entre estágios “guarda-chuva” e cistos em 48 horas após ressemeadura em água do mar. Todos os grupos foram previamente expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. Os valores das colunas representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. ANOVA de uma via. Não foi possível a verificação da normalidade. N=2. Nenhum *outlier* identificado.

re-seeding 48 hours - live nauplii / cyst ratio

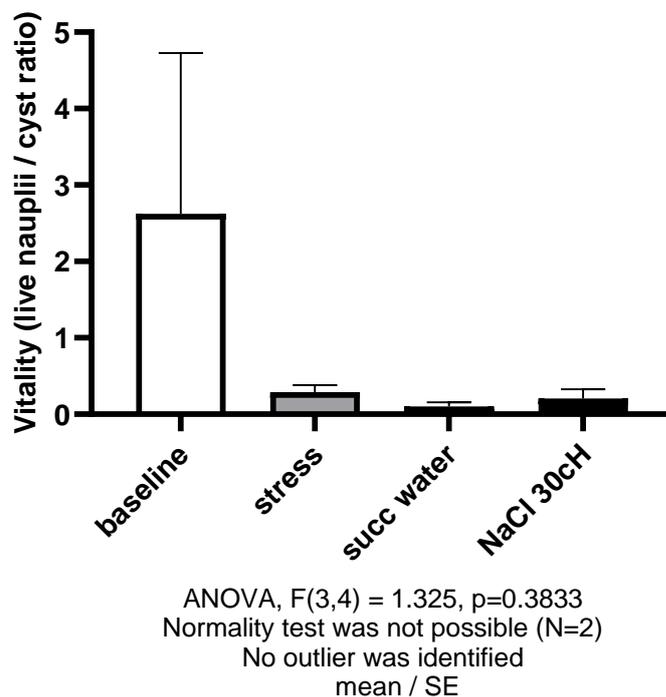


Figura 16. Vitalidade naupliar, medida como razão entre o número de náuplios vivos e o número de cistos semeados após 48 horas após ressemeadura em água do mar. Todos os grupos foram previamente expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. Os valores das colunas representam média e erro padrão. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. ANOVA de uma via. Não foi possível a verificação da normalidade. N=2. Nenhum *outlier* identificado.

6.4. Expressão de genes para HSPs

O estudo da expressão de genes para HSPs a partir do material biológico colhido ao final do experimento 2 mostrou aumento na expressão dos genes *hsp26* e redução na expressão do gene *p26*, ambos relacionados ao *stress* hiposmótico intenso associado ao tratamento com solventes sucussionados (água e NaCl 30CH), independente da substância de partida (cloreto de sódio). A expressão de *hsp40* mostrou tendência de aumento em relação aos controles, mas com grande variância e ausência de significância estatística. A expressão de *hsp90* foi o resultado mais específico observado, com aumento nas amostras submetidas a *stress* hiposmótico tratados com água sucussionada e redução nas amostras submetidas a *stress* e tratadas com NaCl 30CH (**Figura 17**).

Em suma, os efeitos específicos do tratamento de cistos expostos ao *stress* hiposmótico com NaCl 30CH foram observados como redução na expressão dos genes *p26* e de *hsp90* em relação à linha base (cistos mantidos em água do mar, sem *stress* e sem tratamento).

6.5. Interação das amostras com corantes solvatocrômicos

A interação das amostras magnetizadas de NaCl 30CH e seus controles (água, álcool 10%, sucussionados ou não) com corantes solvatocrômicos mostrou interação específica entre as amostras de NaCl 30CH e os corantes *Coumarin 7* e BDN (**Figura 18**). Tendo apresentado significância estatística mais evidente e com ausência de *outliers*, o corante *Coumarin 7* foi escolhido como sendo o método de eleição para a análise das amostras de água obtidas do experimento 2. Assim, a análise das amostras de água mostrou que o corante *Coumarin 7* identificou a presença de NaCl 30CH na água de maneira específica, em comparação aos controles (**Figura 19**).

Houve, portanto, um paralelismo entre os efeitos biológicos específicos do NaCl 30CH sobre a resposta dos embriões de *Artemia franciscana* ao *stress* hiposmótico intenso e a interação desta preparação homeopática com o corante solvatocrômico *Coumarin 7*, sendo esse considerado um marcador para o rastreamento do NaCl 30CH na água.

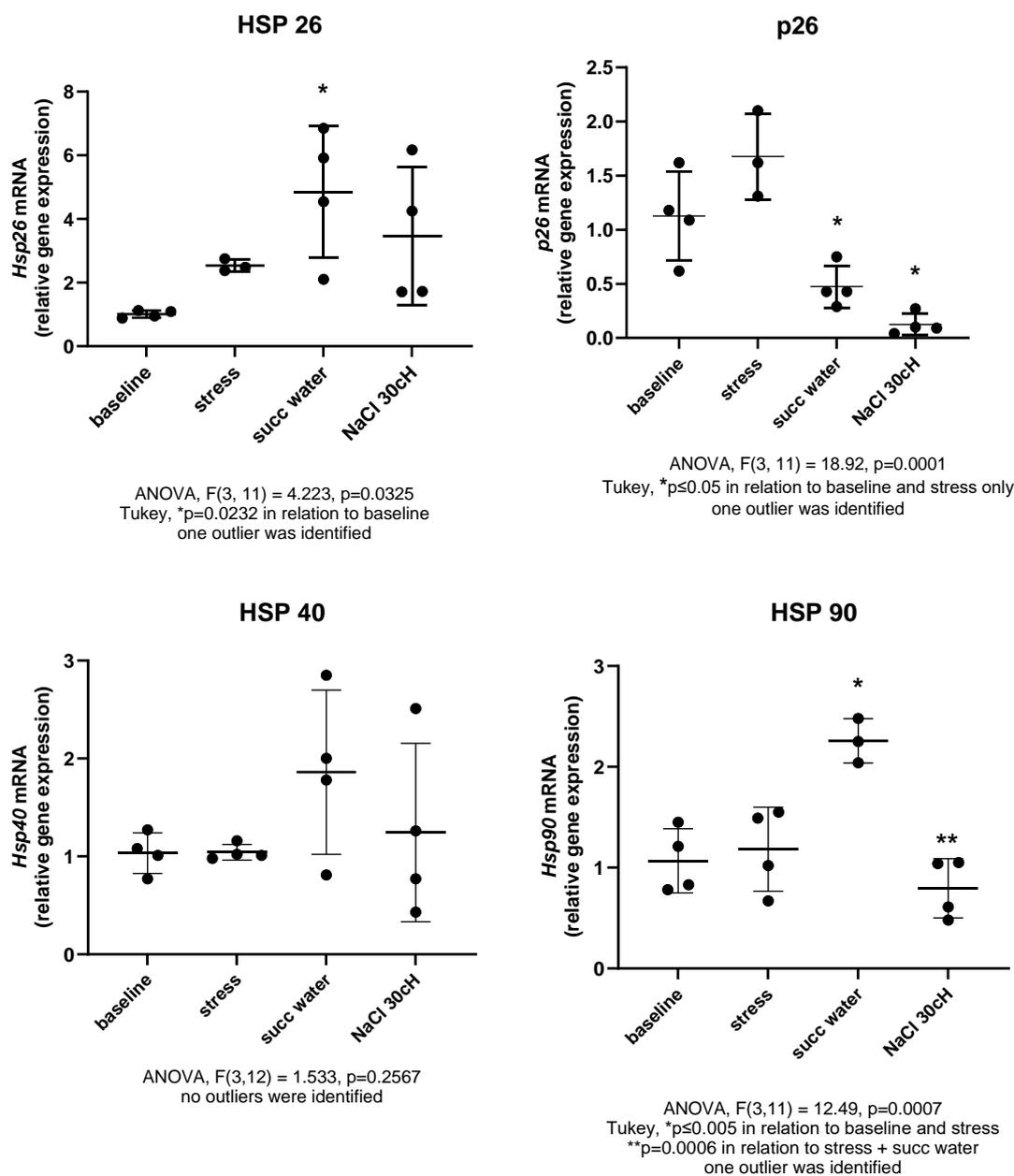
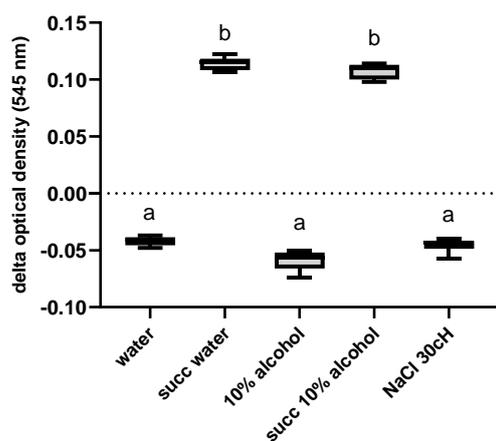


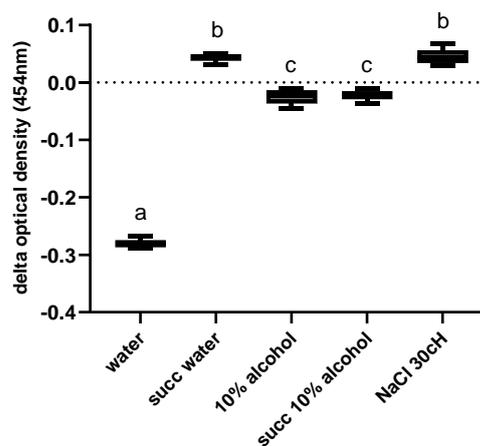
Figura 17. Expressão gênica relativa (mRNA) de *hsp26*, *p26*, *hsp40* e *hsp90*. Todos os grupos foram expostos a *stress* hiposmótico intenso (água purificada), exceto o grupo não desafiado (*baseline*). Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. Os valores das linhas representam média e desvio padrão, os círculos negros representam os valores individuais de cada *pool* de amostras. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. One way-ANOVA, Tukey. N=4.

Nile red - magnet



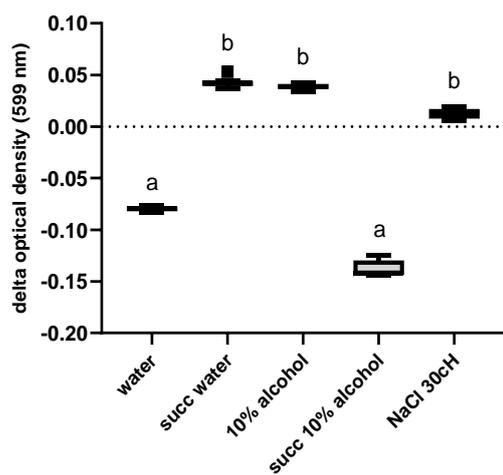
ANOVA, $F(4,32) = 1438.00$, $p \leq 0.0001$.
 Tukey, $p \leq 0.002$ among categories a, b
 three outliers were identified

RHODANINE - magnet



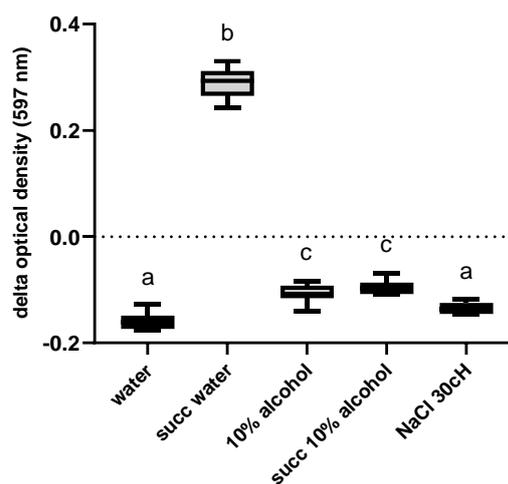
ANOVA, $F(4,32) = 1356.00$, $p \leq 0.0001$.
 Tukey, $p \leq 0.0001$ among categories a, b, c
 three outliers were identified

NN DMIA - magnet



ANOVA, $F(4,35) = 2207.0$, $p \leq 0.0001$.
 Tukey, $p \leq 0.0001$ among categories a, b, c
 no outliers were identified

methylene violet - magnet



ANOVA, $F(4,33) = 769.00$, $p \leq 0.0001$.
 Tukey, $p \leq 0.0001$ among categories a, b, c
 two outliers were identified

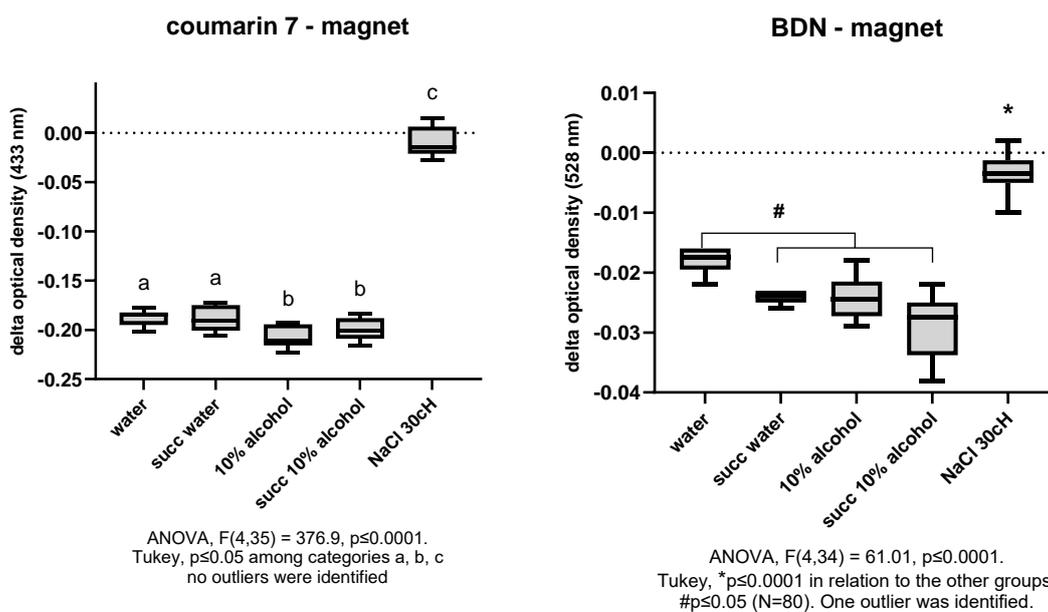
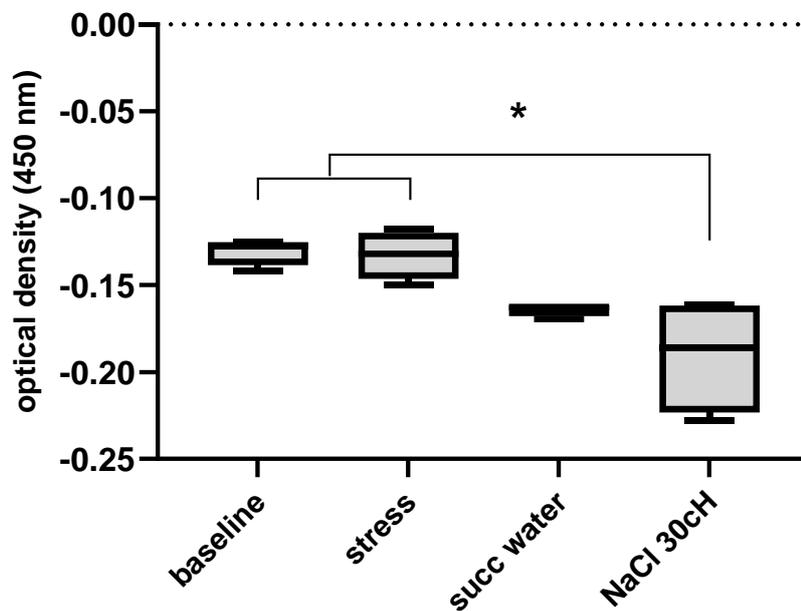


Figura 18. Box-plot da interação de amostras de NaCl 30CH e controles (água, álcool 10%, succussionados ou não) com corantes solvatocrômicos (ver **tabela 2**). Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. One way-ANOVA, Tukey. N=8.

water samples - coumarin 7 - magnet



ANOVA, $F(3, 12) = 9.353$, $p=0.0018$

Tukey, $*p \leq 0.005$. $N=4$.

Figura 19. Box-plot da interação de amostras de água submetida a diferentes tratamentos. *Baseline* refere-se ao controle não tratado e não submetido a *stress*, ou seja, água do mar artificial. Os demais grupos referem-se a amostras de água purificada sob diferentes tratamentos. Os dados estatísticos estão reportados na base das figuras. *Stress* = apenas *stress* hiposmótico; *Succ water* = água sucussionada. One way-ANOVA, Tukey. $N=4$.

7. Discussão

Os mecanismos que envolvem a bioresiliência de *Artemia franciscana* têm sido foco de estudo nos últimos anos, sobretudo no que diz respeito ao comportamento e desenvolvimento destes animais ao serem submetidos a tratamentos homeopáticos. No estudo anterior realizado pelo nosso grupo foram avaliados os efeitos dos isoterápicos na intoxicação de *Artemia salina* por cloreto de mercúrio na concentração efetiva 10%, sendo observada melhor adaptação dos embriões ao ambiente hostil após o tratamento [23].

Em adição a esses estudos, o foco deste projeto foi avaliar a bioresiliência de *A. franciscana* ao ser submetida a *stress* induzido, a partir da avaliação da taxa de eclosão e da vitalidade dos náuplios; da expressão gênica de proteínas de choque térmico (HSPs) e da interação de amostras de insumos homeopáticos - e de água do mar tratada com esses mesmos insumos - com corantes solvatocromicos. Vale mencionar que o objetivo desse projeto não foi estudar a patogênese (resposta de indivíduos saudáveis a preparações homeopáticas) de NaCl 30CH e sim observar os mecanismos envolvendo a modulação da bioresiliência de *Artemia franciscana* pelo tratamento da água com NaCl 30CH frente a um ambiente extremamente hostil para sua sobrevivência.

Como ponto de partida (experimento piloto), foi necessária a identificação do modelo de *stress* e a preparação homeopática que mais se adequasse às condições propostas. Foram testados três tipos de *stress* osmótico, dentre eles: *stress* hiperosmótico, onde as artêmias foram submetidas à solução hipertônica NaCl 5%; *stress* hiposmótico intenso, onde foi utilizada apenas água purificada estéril; e *stress* hiposmótico moderado, onde foi utilizada solução fisiológica (NaCl 0,9%). Em todos os casos, os meios utilizados foram preparados em condição de esterilidade. Todos os grupos (exceto o grupo *baseline*, em que não houve a imputação de nenhum tipo de *stress* ou de tratamento) submetidos a *stress* foram tratados com diversas potências do isoterápico, preparado a partir do próprio cloreto de sódio (NaCl). Neste ensaio, o grupo submetido ao *stress* hiposmótico foi o que mostrou clara diferença entre as taxas de eclosão e mortalidade de náuplios entre os tratamentos, em especial o grupo tratado com NaCl 30CH, onde houve menor taxa de eclosão e mortalidade. Os resultados

detalhados dos outros modelos de *stress* e das outras potências homeopáticas podem ser observados na Tabela 3.

A partir do momento em que o modelo de *stress* mais adequado (*stress* hiposmótico) e a potência mais adequada (NaCl 30CH) foram selecionados, o projeto seguiu para os demais experimentos. No primeiro experimento, foi realizada a avaliação da taxa de eclosão dos cistos sob *stress* hiposmótico intenso utilizando quatro grupos experimentais: três controles (não desafiado, *stress* e *stress* tratado com água sucussionada) e um tratamento (*stress* tratado com NaCl 30CH). Observou-se que a maior parte dos náuplios nasceram com 48 horas, o que é esperado para esse modelo experimental, entretanto, não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos experimentais. Também foi avaliada a razão entre cada estágio naupliar e o número de cistos inicial, e, embora não havendo diferença estatística, observou-se uma dinâmica particular no grupo tratado com NaCl 30CH, com certa redução de estágio “guarda-chuva” dos cistos em 24 horas e maior frequência (retenção) desse estágio em 48 horas (Figura 9). Em relação à vitalidade dos náuplios, pode-se observar uma redução significativa nos grupos submetidos ao *stress* em relação ao grupo controle-*baseline*, não desafiado, o que deixou clara a ação do *stress* nos grupos desafiados.

Frente a esses resultados, um segundo experimento foi realizado, utilizando os mesmos grupos experimentais e observando novamente a eclosão dos cistos. Entretanto, nesta etapa, diferentemente do primeiro experimento, os cistos não receberam alimento a fim de minimizar ao máximo quaisquer interferências entre os sistemas experimentais, uma vez que as amostras seriam utilizadas para análise de expressão gênica. A ausência de alimento durante as primeiras 48 horas de eclosão dos cistos não é prejudicial à fisiologia naupliar, uma vez que nesse período as larvas ainda se alimentam de reservas vitelínicas [25-28, 41]. Em relação a taxa de eclosão, não houve diferença estatística entre os grupos. Contudo, em relação aos cistos em estágio “guarda-chuva”, foi possível observar uma retenção desta fase nos diferentes tratamentos, evidenciada estatisticamente em 48 horas, em que uma relação linear é vista em função das diferentes condições experimentais, sendo o pico de retenção observado no grupo tratado com NaCl 30CH. Também após 48 horas, houve 100% de letalidade em todos os grupos submetidos a *stress*, independente do

tratamento, o que condiz com a agressividade esperada do estímulo frente aos embriões de *Artemia franciscana*. Dado o desfecho inevitável do êxito letal de náuplios em água não salina, a retenção no estágio guarda-chuva poderia ser interpretada como uma eclosão “frustrada”, ou retardada. Talvez o tratamento com NaCl 30CH produza um padrão máximo de desaceleração do processo de eclosão, dada a redução na expressão dos genes *p26* e *hsp90* [88]. Tais dados estão expressos nas Figuras 11, 12 e 13.

No segundo experimento também foi avaliada a reversibilidade do processo, sendo que as placas foram ressemeadas em água do mar após 48 horas de eclosão em ambiente hiposmótico, de forma que os cistos fossem transferidos a um ambiente propício para sua eclosão. Entretanto, pode-se observar a não reversibilidade da inibição de eclosão mesmo em meio adequado, revelando talvez um processo de “memória metabólica” da espécie face ao *stress* sofrido, ou mesmo a morte do embrião durante a diapausa ou o processo de eclosão. Em qualquer das situações, tal irreversibilidade foi independente do tratamento aplicado.

Face a tais constatações, há necessidade de compreender mais elementos sobre os mecanismos que possam estar associados a tal comportamento. Sabe-se que as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* – HSPs) participam ativamente do processo de bioresiliência das artêmias [42 – 44]. As HSPs estão presentes em todos os seres vivos e desempenham um papel fundamental nos processos de sinalização e adaptação celular, cuja função é auxiliar as proteínas em seu processo de dobramento, ou seja, na definição de sua estrutura terciária tridimensional, garantindo que atinjam a conformação espacial correta para que seja possível desempenhar suas funções [21, 25].

Neste estudo, foram quantificadas as expressões dos genes correspondentes às seguintes HSPs: HSP26, p26, HSP40 e HSP90, a partir das amostras do segundo experimento. Pode-se observar, portanto, que a exposição dos cistos ao *stress* produziu discreto aumento na expressão de p26, uma HSP intimamente relacionada ao prolongamento da diapausa [66], mas a associação do *stress* com o tratamento com água sucussionada produziu padrão diverso de expressão gênica, como aumento na expressão do gene *hsp26* e redução na expressão do gene *p26*. Dado que a HSP26 representa um complexo proteico,

cujo elemento principal é a proteína *p26* [66], entende-se que o papel da água sucussionada neste ensaio - incluindo todas as suas características, como presença de nanobolhas e nanoagregados, bem como maior conteúdo de ROS [63] - está provavelmente relacionado a regulação negativa seletiva de processos transcricionais, hipótese a ser verificada em estudos futuros sobre mecanismos de regulação epigenética. Contudo, o tratamento de cistos submetidos a *stress* com NaCl 30CH produziu discreto aumento na expressão do gene *hsp26* e redução estatisticamente significativa na expressão dos genes *p26* e *hsp90*, sendo esses os principais achados deste trabalho.

Sabe-se que a proteína HSP90 aumenta antes e depois da diapausa em *Artemia* sp, podendo ser uma das responsáveis pela transição desse estado de latência embrionária aos estágios seguintes do desenvolvimento [88]. Na diapausa, os cistos não eclodem e todas as suas funções permanecem em dormência até que exista um ambiente propício para eclosão. Além disto, os cistos de *Artemia franciscana* em diapausa contêm quantidades abundantes da proteína *p26* [17]. O fato de ambas as proteínas terem sido menos expressas no grupo submetido ao *stress* e tratado com NaCl 30CH poderia explicar, ao menos em parte, a interrupção da eclosão no estágio “guarda-chuva” dos cistos, com letalidade de 100% dos náuplios. Entende-se que o *stress* hiposmótico intenso (água com 0% de salinidade) possa ser um sinal de alarme máximo, em que a adaptação desses animais não é desejável, uma vez que violaria brutalmente o papel dessa espécie no ecossistema em questão. A ação do NaCl 30CH, sob essa perspectiva, poderia ser vista como uma espécie de “adaptação às avessas” ou um sinal de alarma adicional. Outros exemplos de sinais de alarme que levam a bloqueio da reprodução de espécies sob esse tipo e risco já foram descritos, como um estudo feito por Beux e Zaniboni-Filho (2006) cujo objetivo foi avaliar a sobrevivência de náuplios de *Artemia* sp. submetidos a diferentes concentrações salinas. Neste estudo, foi relatado que há um pequeno tempo de sobrevivência dos náuplios quando submetidos à água hiposmótica [89]. Em outro estudo, Nougé *et al.* (2015) avaliaram a microbiota intestinal das artemias e foi possível observar que, embora a *Artemia salina* possa sobreviver à baixa salinidade, a sua microbiota intestinal tem aptidão reduzida, o que pode influenciar significativamente na sobrevivência destes animais [90].

Dentre as diversas atribuições para o uso da homeopatia, é importante mencionar o potencial uso dessa ciência para o monitoramento ambiental. Já existem alguns estudos acerca deste tema, como os estudos realizados por Souza *et al.* [8], cujo objetivo foi observar a recuperação de áreas prejudicadas e o comportamento de animais ao serem submetidos à homeopatia administrada por um mecanismo de dispersão lenta; e por Salles *et al.* [9] que estudou o uso de corantes solvatocrômicos como ferramenta de rastreamentos em reservatórios de água. O presente estudo representa uma contribuição para essa linha de pesquisa.

Os métodos de rastreamento de potências homeopáticas na água, em especial, o método dos corantes solvatocrômicos, têm sido úteis pelo ponto de vista prático e pelo seu potencial de aplicação nas ciências agrárias e do ambiente [8,9]. Mas também é um recurso valioso para a compreensão dos mecanismos de ação da homeopatia, como demonstra Cartwright [79-83]. Neste estudo foram utilizados diversos corantes para uma triagem inicial e as amostras foram submetidas previamente a um forte campo magnético, conforme descrito em [86]. Nessa triagem, observou-se que as amostras de NaCl 30CH apresentaram interação com os corantes *Coumarin 7* e BDN, sendo os resultados mais contundentes com *Coumarin 7*. Por conta disto, esse corante foi elegível para a análise das amostras de água. Como resultado, foi possível rastrear o NaCl 30CH nas amostras de água tratadas com essa preparação, o que não ocorreu com os controles. Dessa forma, foi possível estabelecer um paralelismo entre os efeitos biológicos específicos do NaCl 30CH sobre a adaptação dos embriões de *Artemia franciscana* ao *stress* hiposmótico intenso e a interação desta preparação homeopática com o corante solvatocrômico *Coumarin 7*. Entende-se, portanto, que a *Coumarin 7* é um possível marcador para o rastreamento de NaCl 30CH em amostras de água, o que pode ser particularmente útil em situações de campo. Associações similares também foram demonstradas em trabalhos anteriores, em que corantes solvatocrômicos também se evidenciaram como bons marcadores físico-químicos passíveis de rastreamento [7-9, 12, 13, 23, 65, 66] corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

Em suma, o efeito do tratamento de cistos submetidos a *stress* hiposmótico com isoterápico de cloreto de sódio 30CH foi registrado por meio de

parâmetros biológicos, especialmente aqueles relacionados à expressão gênica de proteínas associadas a processos de bioresiliência (proteínas de choque térmico), e também de parâmetros físico-químicos, em especial as variações do momento dipolo da água tratada, detectável por meio de corantes solvatocrômicos.

8. Conclusão

O tratamento de cistos de *Artemia franciscana* submetida a stress hiposmótico intenso com NaCl 30CH produziu aumento na retenção da eclosão em estágio “guarda-chuva” e menor expressão dos genes *p26* e *hsp90*. Tais efeitos puderam ser associados ao rastreamento de NaCl 30CH na água, pelo método dos corantes solvatocrômicos. Entende-se tais resultados como a facilitação da interrupção do desenvolvimento embrionário em situações de alto risco.

9. Conflito de interesses

Não há conflito de interesses relacionado a este projeto.

10. Créditos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), processo número 88887.641641/2021-00.

Agradeço também à colega Suham N. Mohammad, pelo auxílio no projeto.

11. Referências

1- Cook S. Quest for an index of community structure sensitive to water pollution. *Environ Pollution*.1976;11:269-288.

- 2 - Azevedo FA. Toxicologia do mercúrio. 1. ed. São Carlos: Rima. São Paulo: Inter Tox, 2003. 292p.
- 3 - Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ pollution* 2008; 151:362-367.
- 4 - Liu RI, Yang Y, Travers MJ, Fong GT, O'Connor RJ, Hyland A, Li L, Nan Y, Feng GZ, Li Q, Jiang Y. A cross-sectional study on levels of second-hand smoke in restaurants and bars in five cities in China. *Tobacco Control* 2010; suppl. 2: i24-i29.
- 5 - Tilley E, Ulrich L, Lüthi C, Reymond P, Zurbrügg C. Compendium of sanitation systems and technologies. 2nd Revised Edition. Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag). Dübendorf, Switzerland. 2014. 176p.
- 6 - Pennino MJ, Compton JE, Leibowitz SG. Trends in Drinking Water Nitrate Violations Across the United States. *Environ. Sci. Technol.* 2017; 51:22, 13450-13460.
- 7 - Aparício ACC, de Oliveira LHS, Silva JS, Coelho CP, Pinheiro SR, Souza MF, Suffredini IB, Cartwright SJ, Bonamin LV. Interaction between Solvatochromic Dyes and Water Sampled from a Natural Source Treated with High Dilutions of Phosphorus. *Homeopathy*, 2020. doi:10.1055/s-0039-3400255.
- 8 – Souza MFA, Felicio AP, Cucco MA, *et al.* Clinical observation of wild animals near the CRAS lake (Mato Grosso do Sul, Brazil) submitted to homeopathic treatment by a slow dispersion device: a possible indication of environment balance. Proceedings of the XXXVI GIRI meeting, Farmington CT – USA; October 20-22, 2023. *International Journal of High Dilution Research*, 2023, 22. *In press.*
- 9 – De Medeiros NSS, Frana S, Souza MF, *et al.* Solvatochromic dyes as a tool for tracking homeopathic complex activity in water reservoirs of a spring park in Brazil: Physicochemical implications. Proceedings of the XXXVI GIRI meeting, Farmington CT – USA; October 20-22, 2023. *International Journal of High Dilution Research*, 2023, 22. *In press.*
- 10 - Braccini GL, Casetta J, Silva SCC, Carniatto CHO, Santos, VDR, Costa VF. Aplicação da homeopatia na produção animal. *Revista Valore, Volta Redonda*, 4 (Edição Especial): 310-323., 2019.

11 - Miranda AR. Water and High Dilutions Phenomenology: Physical Characterization. In: Bonamin L.V. (Ed.) Signals and Images. Contributions and Contradictions in High Dilution Research. 2008; Dordrecht. Springer. pp 49-63.

12 - Pinto, SAG. Caracterização de corantes solvatocrômicos como marcadores físico-químicos de medicamentos homeopáticos e de amostras de sobrenadantes / Sandra Augusta Gordinho Pinto. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2021. 80 p. c

13 - Bonamin LV, Pedro RRP, Mota HMG, Aguiar MSC, Pinto SAG, de Souza J, de Oliveira LHS, Aparicio AC, Peres GB, Suffredini IB, Dutra-Correa M, Cartwright SJ. Caracterização da atividade do *Antimonium crudum* utilizando corantes solvatocrômicos. Homeopatia, 2020. 109 (2):79-86. doi: 10.1055/s-0039-1697000.

14 - Cartwright SJ (2020). Potências homeopáticas podem possuir um componente semelhante a um campo elétrico: evidências do uso de corantes solvatocrômicos encapsulados. Homeopatia 109 (1):14-22. doi: 10.1055/s-0039-1693985.

15 - Martins J, Oliva Teles L, Vasconcelos V. Ensaio com *Daphnia magna* e *Danio rerio* como sistemas de alerta em toxicologia aquática. Meio Ambiente Internacional, 2007, 33 (3): 414–425. doi:10.1016/j.envint.2006.12.06.

16 - King AM, Toxopeus J, Macrae, TH. Functional differentiation of small heat shock proteins in diapause-destined *Artemia* embryos. FEBS Journal, 2013, 280(19), 4761–4772. doi:10.1111/febs.12442.

17 - King AM, Macrae, TH. The Small Heat Shock Protein p26 Aids Development of Encysting *Artemia* Embryos, Prevents Spontaneous Diapause Termination and Protects against *Stress*. PLoS ONE, 2012, 7(8), e43723. doi:10.1371/journal.pone.0043723.

18 - Mukherjee A, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh, AR. Homeopathic Thuja 30C ameliorates benzo(a)pyrene-induced DNA damage, *stress* and 39 viability of perfused lung cells of mice in vitro. J Integr Med. 2013 Nov;11(6):397- 404. doi: 10.3736/jintegrmed2013054. PMID: 24299603.

- 19 - Scott CA, Vicuña S, Blanco-Gutiérrez I, Meza F, Varela-Ortega C. Irrigation efficiency and water-policy implications for river basin resilience. *Hydrology and Earth System Sciences*, 2014, 18(4), 1339-1348. Doi: 10.5194/hess-18-1339-2014.
- 20 - Adler N, Friedman L, Sinuany-Stern Z. Review of ranking methods in the data envelopment analysis context. *European Journal of Operational Research*. 2002, 140(2), 249–265. DOI:10.1016/S0377-2217(02)00068-1.
- 21 - Washington-Allen RA, et al. Quantificação da Resiliência Ecológica de Áreas Secas Utilizando Sensoriamento Remoto Digital. *Ecology and Society* iss1/art23/, 2008. 13(1: 33).
- 22 - Jafarzadeh N, Mirbagheri Sa, Rajaei T, Danehkar A, Robati M. Using Artificial Intelligent to Model Predict the Biological Resilience With an Emphasis on Population of cyanobacteria in Jajrood River in The Eastern Tehran, Iran. *J Environ Health Sci Eng*. 2022 Jan 13;20(1):123-138. doi: 10.1007/s40201-021-00760-4. PMID: 35669838; PMCID: PMC9163274.
- 23 - Pinto AAG, Nagai MYO, Coimbra EN, Mohammad SN, Silva JS, Von Ancken A, Pinto SAG, Aguiar MS, Dutra-Correa M, Hortellani MA, Miranda A, Sarkis JES, Suffredini IB, Peres GB, Bernardi MM, Cartwright SJ, Bonamin LV. Bioresilience to Mercury Chloride of the Brine Shrimp *Artemia salina* after Treatment with Homeopathic *Mercurius corrosivus*. *Homeopathy* 2021; 110(04): 244-255. DOI: 10.1055/s-0041-1729562.
- 24 - Narayana S, Chitra J, Tapase SR, Thamke V, Karthick P, Ramesh CH, Murthy KN, Ramasamy M, Kodam KM, Mohanraju R. Toxicity Studies of *Trichodesmium erythraeum* (Ehrenberg, 1830) bloom extracts from Phoenix Bay, Port Blair, Andamans. *Harmful Algae*. 40, 34-39. 2014.
- 25 - Rowarth NM, Macrae TH. (2018). Post-diapause synthesis of ArHsp40-2, a type 2 J-domain protein from *Artemia franciscana*, is developmentally regulated and induced by *stress*. *PLOS ONE*. 2018; 13(7): e0201477. doi:10.1371/journal.pone.0201477.
- 26 - Thomas H, Macrae TH. *Stress* tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, *Artemia*. *Cell Stress and Chaperones*, 2015: 21(1), 9–18. doi:10.1007/s12192-015-0635-7.

- 27 - Tan J, Macrae TH. The synthesis of diapause-specific molecular chaperones in embryos of *Artemia franciscana* is determined by the quantity and location of heat shock factor 1 (Hsf1). *Cell Stress Chaperones*. 2019 Mar;24(2):385-392. doi: 10.1007/s12192-019-00971-7.
- 28 - Tan J, Macrae TH. Stress tolerance in diapausing embryos of *Artemia franciscana* is dependent on heat shock factor 1 (Hsf1). *PLOS ONE*, 2018, 13(7), e0200153. doi:10.1371/journal.pone.0200153.
- 29 - Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852– 1858. 2002.
- 30 - KARP G. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos*. 3a Ed. Editora Manole, São Paulo, p.832.
- 31 - Carver JA, Rekas A, Thorn DC, Wilson MR. Small heat-shock proteins and clusterin: intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function? *IUBMB Life*. Dec;55(12):661-8. Doi: 10.1080/15216540310001640498. PMID: 14769002, 2003.
- 32 - Zuehlke AD, Moses MA, Neckers L. Proteína de choque térmico 90: sua inibição e função. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2017, 373(1738), 20160527. Doi:10.1098/rstb.2016.0527.
- 33 - Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 29;19(9):2560. doi: 10.3390/ijms19092560.
- 34 - Peng C, Zhao F, Li H, Li L, Yang Y, Liu F. HSP90 mediates the connection of multiple programmed cell death in diseases. *Cell Death Dis*. 2022 Nov 5;13(11):929. doi: 10.1038/s41419-022-05373-9. PMID: 36335088; PMCID: PMC9637177.
- 35 - Tsan, MF, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 286, C739– C744. 2004.
- 36 - Pockley AG, Muthana M, Caderwood SK. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem. Sci*. 33, 71– 79. 2008.
- 37 - Genest O, Wickner S, Doyle SM. Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling. *J Biol Chem*. 2019 Feb 8;294(6):2109-2120.

doi: 10.1074/jbc.REV118.002806. Epub 2018 Nov 6. PMID: 30401745; PMCID: PMC6369297.

38 - Roy S, Kumar V, Bossier P, Norouzitallab P, Vanrompay D. Phloroglucinol Treatment Induces Transgenerational Epigenetic Inherited Resistance Against *Vibrio* Infections and Thermal *Stress* in a Brine Shrimp (*Artemia franciscana*) Model. *Front Immunol.* 2019 Nov 27;10:2745. doi: 10.3389/fimmu.2019.02745. PMID: 31827471; PMCID: PMC6890837.

39 - Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J.* 2016 Aug 15;473(16):2439-52. doi: 10.1042/BCJ20160005. PMID: 27515256; PMCID: PMC4980810.

40 - Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Nov;20(11):665-680. doi: 10.1038/s41580-019-0133-3. PMID: 31253954.

41 - Clegg JS, Jackson SA, Popov VI. Long-term anoxia in encysted embryos of the crustacean, *Artemia franciscana*: viability, ultrastructure, and *stress* proteins. *Cell Tissue Res.* 2000 Sep;301(3):433-46. doi: 10.1007/s004410000249. PMID: 10994789.

42 - Han J, Park Y, Shin HH, Shin AY, Kang HM, Lee J, Choi YU, Lee KW. Effects of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on swimming behavior and expression of heat shock protein (hsp) genes in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Harmful Algae.* 2021 Dec; 110:102146. doi: 10.1016/j.hal.2021.102146. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34887001.

43 - Aruda AM, Baumgartner MF, Reitzel AM, Tarrant AM. Heat shock protein expression during *stress* and diapause in the marine copepod *Calanus finmarchicus*. *J Insect Physiol.* 2011 May;57(5):665-75. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.03.007. Epub 2011 Mar 16. PMID: 21419129.

44 - King AM, Toxopeus, J, Macrae TH. (2014). Artemin, a diapause-specific chaperone, contributes to the *stress* tolerance of *Artemia franciscana* cysts and influences their release from females. *Journal of Experimental Biology*, 217(10), 1719–1724. doi:10.1242/jeb.100081.

45 – Teixeira MZ. Isopathic Use of Auto-Sarcode of DNA as Anti-Miasmatic Homeopathic Medicine and Modulator of Gene Expression? *Homeopathy.* 2019

May;108(2):139-148. doi: 10.1055/s-0038-1676810. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30759480.

46 - Marotti I, Betti L, Bregola V, Bosi S, Trebbi G, Borghini G, Nani D, Dinelli G. Transcriptome Profiling of Wheat Seedlings following Treatment with Ultrahigh Diluted Arsenic Trioxide. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 2014:851263. doi: 10.1155/2014/851263.

47 - Şeker S, Güven C, Akçakaya H, Bahtiyar N, Akbaş F, Onaran İ. Evidence that Extreme Dilutions of Paclitaxel and Docetaxel Alter Gene Expression of In Vitro Breast Cancer Cells. *Homeopathy*. 2018 Feb;107(1):32-39. doi: 10.1055/s-0037-1618585.

48 - López-Carvallo JA, Mazón-Suástegui JM, Hernández-Oñate MÁ, Tovar-Ramírez D, Abasolo-Pacheco F, Morelos-Castro RM, Arcos-Ortega GF. Transcriptome analysis of Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) juveniles treated with highly-diluted immunomodulatory compounds reveals activation of non-self-recognition system. *PLoS One*. 2020 May 14;15(5):e0233064. doi: 10.1371/journal.pone.0233064.

49 - Marzotto M, Arruda-Silva F, Bellavite P. Fibronectin Gene Up-regulation by Arnica montana in Human Macrophages: Validation by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Homeopathy*. 2020 Aug;109(3):140-145. doi: 10.1055/s-0040-1708044.

50 - Bishayee K, Sikdar S, Khuda-Bukhsh AR. Evidence of an Epigenetic Modification in Cell-cycle Arrest Caused by the Use of Ultra-highly-diluted *Gonolobus Condurango* Extract. *J Pharmacopuncture*. 2013 Dec;16(4):7-13. doi: 10.3831/KPI.2013.16.024. PMID: 25780677; PMCID: PMC4331975.

51 - Siqueira CM. Caracterização da histona desacetilase 2 (TgHDAC2) de *Toxoplasma gondii*. 2018. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, PR, 2018.

52 - Hahnemann S. Ensaio sobre um novo princípio para se averiguar o poder curativo das drogas. *Ver Homeopatia*; 59(3-4):32-65. 1994.

- 53 - Benites NR, Spinosa H S, Górnica S L, Bernardi M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2006; p.827-835.
- 54 - Bellavite P, Signorini A, Marzotto M, Moratti E, Bonafini C, Oliosio D. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. *Homeopathy*. 2015; 104: 139-160.
- 55 - Bagai U, Walter NS. Antiplasmodial potential of homeopathic drugs Chelidonium and nosode against *Plasmodium berghei* infection. *J Complement Integr Med*. 2014; 11: 195-201.
- 56 - Santana FR, Coelho CP, Cardoso TN, Perez-Hurtado EC, Benites NR, Laurenti MD, Bonamin LV. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: *Antimonium crudum* 30CH. *Homeopathy*. 2014; 103: 264-274.
- 57 - Demangeat JL. Gas nanobubbles and aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization. *Homeopathy*. 2015; 104(2):101-115.
- 58 - Endler PC, Bellavite P, Bonamin LV, Jäger T, MAZON S. Replications of fundamental research models in ultra-high dilutions 1994 and 2015 – update on a bibliometric study. *Homeopathy*. 2015; 104: 234-45.
- 59 - Lopes CR, Falkowski GJ, Brustolin CF, Massini PF, Ferreira EC, Moreira NM, Aleixo DL, Kaneshima EN, de Araújo SM. Highly diluted medication reduces tissue parasitism and inflammation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. *Homeopathy*. 2016; 105(2):186-93.
- 60 - Bonamin LV. Descobrimos como a homeopatia funciona. e-Book. 1 ed. São Bernardo do Campo, 2016. 73p. ISBN 978-85-921613-0-9. Disponível em www.biodilutions.com. Visualizado em 27 de dezembro de 2019.
- 61 - Bonamin, LV. A Solidez da Pesquisa Básica em Homeopatia. *Revista de Homeopatia*, 80: 89-97. 2017.
- 62 - Bonamin LV. *Discovering How Homeopathy Works*. Kindle-Amazon. 101pp. 2018.
- 63 - Nagai MY, Dalboni LC, Cardoso TN, Correia MS, Pinto SAG, Pinto AAG, Coelho CP, Alvarez-Saraiva A, Peres GB, Lallo MA, Bonamin LV. Effects of Homeopathic Phosphorus on *Encephalitozoon cuniculi*-Infected Macrophages

In-Vitro. Homeopathy. 2019 Aug;108(3):188-200. doi: 10.1055/s-0039-1678700. Epub 2019 Apr 18. PMID: 30999383.

64 - Nagai MYO, Von Ancken ACB, Bonamin LV, Effects of Highly Diluted Substances on Aquatic Animals: A Review. High Dilutions. Water Special Edition: High Dilutions. 2022. 1-10pg. Doi:10.14294/WATER. 2022. S11.

65 - Nagai MYDO, Mohammad SN, Pinto AAG, Coimbra EN, Peres GB, Suffredini IB, Bernardi MM, Tournier AL, Jerman I, Cartwright SJ, Bonamin LV. Highly Diluted Glyphosate Mitigates Its Effects on *Artemia salina*: Physicochemical Implications. Int J Mol Sci. 2023 May 30;24(11):9478. doi: 10.3390/ijms24119478. PMID: 37298430; PMCID: PMC10253569.

66 - Mohammad SN. Eco-homeopatia: As potências homeopáticas regulam o crescimento e a toxicidade de *Raphidiopsis raciborskii* (cianobactérias) e podem ser rastreadas físico-quimicamente. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. São Paulo, 2023. 126p.

67 - Lee MN, Kim SK, Li XH, Lee JH. Bacterial virulence analysis using brine shrimp as an infection model in relation to the importance of quorum sensing and proteases. J Gen Appl Microbiol. 2014; 60:169-74.

68 - Norouzitallab P, Baruah K, Vanrompay D, Bossier P. Teaching Shrimps Self-Defense to Fight Infections. Trends Biotechnol. 2019; 37: 16-19.

69 - Carvalho CA. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers- Bignoniaceae): Estudo fitoquímico etoxicológico envolvendo *Artemia salina*. Revista Eletrônica de Farmácia Vol 6(1), 51-58. 2009.

70 - Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espindola ELG. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. Química Nova. 2008; 31: 1820-1830. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n7/v31n7a38.pdf>. Visualizado em 27 de dezembro de 2019.

71 - Camara MR, Castro EV. *Artemia salina* L. (Anostraca): uma opção para a aquicultura do Nordeste do Brasil. Rev. Bras. Zool. 1982; 1: 145-147. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751982000300002>. Visualizado em 27 de dezembro de 2019.

- 72 - Olson CS. Timing of developmental events in *Artemia salina* (L.) (Anostraca). *Crustaceana*. 1979; 36: 302-308.
- 73 - Abatzopoulos TJ, Kappas I, Bossier P, Sorgeloos P, Beardmore JA. Genetic characterization of *Artemia tibetiana* (*Crustacea: Anostraca*). *Biological Journal of the Linnean Society*. 2002; 75: 333–344.
- 74 - Abatzopoulos TJ, Beardmore J, Clegg JS, Sorgeloos P. (Ed.). *Artemia: basic and applied biology*. Dordrecht, Springer. 1a ed. Reprint. 2010. 304p.
- 75 - Zagatto PA, Bertolleti EB. *Aquatic ecotoxicology—principles and applications*. RiMa, São Carlos-Brasil. 472p. 2008.
- 76 - Gostling NJ, Dong X, Donoghue PC. Ontogeny and taphonomy: an experimental taphonomy study of the development of the brine shrimp *Artemia salina*. *Palaeontology*. 2009; 52: 169-186. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1475-4983.2008.00834.x>. Visualizado em 27 de dezembro de 2019.
- 77- Christensen A. (2011). "Hatching brine shrimp (*Artemia salina*) time-lapse" (Video-file). Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=B3U3Y1LiRoY>. Visualizado em 27 de dezembro de 2019.
- 78 - Brasil. *Farmacopeia Homeopática Brasileira*, 3a. ed. 2011. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/3a_edicao.pdf. Acesso em 13 de fevereiro de 2020.
- 79 - Cartwright SJ. Solvatochromic dyes detect the presence of homeopathic potencies. *Homeopathy*. 2016; 105: 55–65.
- 80- Cartwright SJ. Interaction of homeopathic potencies with the water soluble solvatochromic dye bis-dimethylaminofuchson. Part 1: pH studies. *Homeopathy* 2017; 106: 37–46.
- 81 - Cartwright SJ. Degree of response to homeopathic potencies correlates with dipole moment size in molecular detectors: implications for understanding the fundamental nature of serially diluted and succussed solutions. *Homeopathy* 2018; 107: 19–31.

82 - Cartwright SJ. Homeopathic potencies may possess an electric field(-like) component: evidence from the use of encapsulated solvatochromic dyes. *Homeopathy* 2020; 109: 14–22.

83 - Cartwright SJ. Immobilization of Solvatochromic Dyes on Transparent Cellulose Films: an Improved Method for the Study of Homeopathic Potencies. *Homeopathy*. 2022. doi: 10.1055/s-0042-1751255.

84 - Brasil. MAPA. Portaria N° 52, de 15 de março de 2021. Sistemas orgânicos de produção e as listas de substância e práticas para o uso nos sistemas orgânicos de produção, alterado pela portaria n°404/2022. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/arquivos-organicos/PORTARIA_MAPA_N_52.2021_- ALTERADA_PELA_PORTARIA_MAPA_N_404.pdf. Acesso em 30 de agosto de 2023.

85 - Konovalov A, Ryzhkina I, Maltzeva E, Murtazina L, Kiseleva Y, KASPAROV V, Palmira N. Nanoassociate formation in highly diluted water solutions of potassium phenosan with and without permalloy shielding. *Electromagn Biol Med*. 2015; 34: 141-6.

86 - Mohammad SN, Pinto AAG, Nagai MYO, Coimbra EM, Suffredini IB, PERES GB, Bernardi MM, Bonamin LV. Interference of Water and Environmental Variables on Lead Chloride Toxicity in *Artemia salina* Model. *Water J*. 2022. Special Edition for the 9th World Water Forum Dakar, Senegal, March 2022. <https://doi.org/10.14294/WATER.2022.S5>.

87 - Melo ENC. Efeito protetor do isoterápico sobre a eclosão de cistos de *Artemia salina* intoxicadas com arseniato de sódio. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2020.131p.

88 - Rinehart, JP, Denlinger DL. Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal *stress*. *Insect Molecu. Biol*. 2000; 9, 641-645.

89 – Beux L, Zaniboni-Filho E. (2006). Influência da baixa salinidade na sobrevivência de náuplios de *Artemia* sp. *Boletim do Instituto de Pesca*. 32. 73-77.

90 - Nougé O, Gallet R, Chevin LM, Lenormand T. Niche Limits of Symbiotic Gut Microbiota Constrain the Salinity Tolerance of Brine Shrimp. *Am Nat.* 2015; 186(3):390-403.