

UNIVERSIDADE PAULISTA

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE MACROFÁGICA PELA
ASPIRINA 15 CH *IN VITRO***

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

ADALBERTO DO CARMO BRAGA VON ANCKEN

SÃO PAULO

2021

UNIVERSIDADE PAULISTA

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE MACROFÁGICA PELA
ASPIRINA 15 CH *IN VITRO***

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

Parceria internacional / Co-orientação

Prof. Dr. Francisco Xavier Eizayaga

Universidade de Maimónides / BA / Argentina

ADALBERTO DO CARMO BRAGA VON ANCKEN

SÃO PAULO

2021

Von Ancken, Adalberto do Carmo Braga.
Regulação da atividade macrofágica pela aspirina 15 cH in vitro /
Adalberto do Carmo Braga von Ancken. - 2021.
83 f.: il. color. + CD-ROM.

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

Área de concentração: Ecotoxicologia e inovações terapêuticas.

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

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Xavier Eizayaga.

1. Homeopatia. 2. Macrófagos. 3. Aspirina. I. Bonamin, Leoni Villano
(orientadora). II. Eizayaga, Francisco Xavier (coorientador). III. Título.

ADALBERTO DO CARMO BRAGA VON ANCKEN

**REGULAÇÃO DA ATIVIDADE MACROFÁGICA PELA
ASPIRINA 15 CH *IN VITRO***

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

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____	____/____/____
Profa. Dra. Leoni V Bonamin Universidade Paulista - UNIP	
_____	____/____/____
Profa. Dra. Anuska Alvares-Saraiva Universidade Paulista - UNIP	
_____	____/____/____
Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva Universidade Paulista – UNIP	
_____	____/____/____
Profa. Dra. Carla Holandino Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ	
_____	____/____/____
Prof. Dr. Francisco Xavier Eizayaga Universidad de Maimónides - Argentina	

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin, pela oportunidade que me foi dada, tanto na pós-graduação quanto nas atividades junto ao IJHDR e pela condução segura deste trabalho ao longo de todos esses anos. Meu muito obrigado por sua humildade e por simplesmente permitir ser eu mesmo.

À CAPES-PROSUP pela bolsa, modalidade taxa, recebida para a realização deste programa de doutorado.

À enriquecedora co-orientação do Prof. Dr. Francisco Xavier Eizayaga, que foi exercida ao longo dos anos de 2018/2019/2020 em conversas e trocas de arquivos por e-mail e whatsapp com os participantes deste projeto.

À Prof.a. Dra. Anuska Alvares-Saraiva, pela ajuda nos ensaios de dosagem de peróxidos e óxido nítrico; ao Prof. Dr. Giovani Bravin Peres pelo suporte nas análises estatísticas, à Profa Dra. Elizabeth Cristina Hurtado Perez, por toda a colaboração nos procedimentos de citometria de fluxo, à Dra. Sandra Patrícia Kalil Perdomo, pela fundamental assessoria nos experimentos de atividade e viabilidade celulares e Dra. Ivana Suffredini, pelas análises físico-químicas.

À HD Science: gratidão por tudo!!!!

Aos meus pares do grupo de pesquisa: Andrea Godinho Pinto, Mirian Yaeko Nagai, Suham Nowrooz Mohammad, Ednar do Nascimento Coimbra Melo, Edgard Vilhena, Nathalia Salles, Lorena Cassis e, em especial, à colega Sandra Godinho Pinto, por todos os ensinamentos sobre a cultura de macrófagos.

Aos meus pais queridos, Valter Dário e Maria Tereza, e aos meus irmãos Renata e Guilherme com seus cônjuges. Gratidão por todo o suporte e apoio em momentos em que a vida parecia não apresentar alternativas.

Por último, porém o mais importante, a esta força superior que nos rege, nos tira e nos dá, que fecha e abre portas enfim, que nos mostra que são nos momentos de felicidade que devemos nos manter em alerta! Obrigado!

“ As convicções são inimigas mais perigosas da verdade do que as mentiras”

NIETZSCHE

REGULAÇÃO DA ATIVIDADE MACROFÁGICA PELA ASPIRINA 15 CH *IN VITRO*

Resumo

Introdução: plaquetas e o endotélio de vasos interagem em direção da homeostase circulatória durante processos inflamatórios, contudo, efeitos paradoxais podem ocorrer em função do balanço entre mediadores anti e pró-trombóticos. A administração de uma única e alta dose de Aspirina pode ocasionar a formação de trombos arteriais em oito a dez dias. Tem-se observado que Aspirina ultradiluída também promove trombogênese após uma hora de administração, porém não é sabido se ambos os casos envolvem a mesma via regulatória. Os efeitos antitrombóticos de altas doses podem ser revertidos pela ação protrombótica da Aspirina ultradiluída. Para compreender os mecanismos envolvidos nessa regulação, postula-se que a Aspirina ultradiluída tenha seu mecanismo de ação relacionado a efeito rebote envolvendo COX-2 e células inflamatórias, como macrófagos. **Objetivo:** Estudar os efeitos da Aspirina 15 cH sobre macrófagos ativados ou não por LPS, um ativador de COX-2. **Métodos:** Água, água sucussionada e Aspirina 200 µg/ml foram usadas como controle. A atividade macrofágica foi estudada mediante avaliação de espraiamento; dosagens de óxido nítrico, peróxidos, citocinas, quimiocinas; expressão de receptores TLR4, viabilidade celular e produção intracelular de espécies reativas de oxigênio. **Resultados:** O tratamento das células com Aspirina 15 cH levou a aumento no *spreading* e produção de H₂O₂ com a mesma magnitude do LPS, mas anulou seu efeito quando administrados ambos conjuntamente. A Aspirina 200 µg/ml produziu efeito anti-inflamatório clássico em todos os parâmetros analisados, revertendo os efeitos do LPS. A água sucussionada *per se* mostrou efeitos pró-inflamatórios independente do LPS, como aumento de *spreading* e redução de IL 10; ação regulatória sobre a produção de TNF e H₂O₂ e aumento na atividade oxidativa celular, com efeito paradoxal após estímulo com LPS. O tratamento com Aspirina 15 cH não alterou a atividade oxidativa intracelular, mas água sucussionada elevou o número absoluto de células que expressam essa atividade. A expressão de TLR-4, por sua vez, foi significativamente maior nos grupos tratados com LPS, independentemente dos co-tratamentos. **Conclusão:** O efeito paradoxal da Aspirina 15 cH observado *in vivo* foi reproduzido neste modelo *in vitro*. A Aspirina 15 cH isoladamente ou em associação com LPS produz efeitos antagônicos, com reversão de efeitos sobre *spreading* e produção de H₂O₂. Especula-se que sua ação seja sobre as proteínas dos microtúbulos, favorecendo o *spreading*. A Aspirina 200 µg/ml produz efeitos anti-inflamatórios clássicos e a água sucussionada produz efeitos pró-inflamatórios e regulação de TNF e H₂O₂ após o estímulo com LPS.

PALAVRAS-CHAVE: Aspirina, homeopatia, macrófagos, LPS

REGULATION OF MACROPHAGE ACTIVITY BY ASPIRIN 15 CH *IN VITRO*

Abstract

Introduction: platelets and endothelium interact towards circulatory homeostasis during inflammatory processes however, paradoxical effects may occur due to the balance between anti and prothrombotic mediators. The administration of a single high dose of Aspirin can lead to the formation of arterial thrombi in eight to ten days. It has been observed that ultra-diluted aspirin also promotes thrombogenesis after one hour of administration, but it is not known whether both cases involve the same regulatory pathway. The antithrombotic effects of high doses can be reversed by the prothrombotic action of ultra-diluted aspirin. To understand the mechanisms involved in this regulation, it is postulated that ultra-diluted aspirin has its mechanism of action related to a rebound effect involving COX-2 and inflammatory cells, such as macrophages. **Objective:** To study the effects of Aspirin 15 cH on macrophages activated or not by LPS, a COX-2 activator. **Methods:** Water, succussed water and Aspirin 200 µg/ml were used as controls. The macrophage activity was studied by means of spreading evaluation; nitric oxide, peroxides, cytokines, and chemokines measurements; expression of TLR4 receptors; cell viability and intracellular production of reactive oxygen species. **Results:** The treatment of cells with Aspirin 15 cH led to increase in the cell spreading and production of H₂O₂, with the same magnitude as LPS did, but nullified its effect when both were administered together. Aspirin 200 µg/ml produced a classic anti-inflammatory effect in all parameters analyzed, reversing the effects of LPS. Succussed water *per se* showed pro-inflammatory effects independent of LPS, such as increase in the cell spreading and reduction of IL 10; as well as regulatory action on the production of TNF and H₂O₂. Moreover, it increased the cellular oxidative activity, with paradoxical effect after stimulation with LPS. Treatment with Aspirin 15 cH did not change the intracellular oxidative activity, but succussed water increased the absolute number of cells that express this activity. TLR-4 expression, in turn, was significantly higher in LPS-treated groups, regardless of the co-treatments. **Conclusion:** The paradoxical effect of Aspirin 15 cH observed *in vivo* was reproduced in this *in vitro* model. Aspirin 15 cH alone or in association with LPS produces antagonistic effects, with reversal of the effects on spreading and production of H₂O₂. It is speculated that it could act on microtubule proteins, favoring the spreading. Aspirin 200 µg/ml produces classic anti-inflammatory effects and succussed water produces pro-inflammatory effects and regulation of TNF and H₂O₂ after being stimulated with LPS.

KEYWORDS: Aspirin, homeopathy, macrophages, LPS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo das 20 imagens capturadas por lamínula.....	31
Figura 2 – Fotomicrografias de macrófagos aderidos a lamínulas e cultivados em meio R10, desafiados com LPS 1µg/ml e expostos por 24 horas a diferentes tratamentos.....	38
Figura 3 – Controle sistemático: Área celular média, em pixels, para demonstração do espraiamento dos macrófagos RAW 264.7 após diferentes estímulos e tratamentos.....	39
Figura 4 – Área celular média, em pixels, para demonstração do espraiamento dos macrófagos RAW 264.7 após diferentes estímulos e tratamentos.....	39
Figura 5 – Controle sistemático: Concentrações de H ₂ O ₂ (nM / 5x10 ⁵ células) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada.....	40
Figura 6 – Concentrações de H ₂ O ₂ (nM / 5x10 ⁵ células) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos.....	41
Figura 7 – Controle sistemático: Concentrações de nitrito (µM / 5x10 ⁵ células) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada	42
Figura 8 – Concentrações de nitrito (µM / 5x10 ⁵ células) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos	42
Figura 9 - Controle sistemático: Concentrações de TNF-α (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada.....	44
Figura 10 - Concentrações de TNF-α (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos.....	44
Figura 11 – Controle sistemático: Concentrações de IL-6 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada.....	45
Figura 12 – Concentrações de IL-6 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos.....	45
Figura 13 – Controle sistemático: Concentrações de IL-10 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada	46
Figura 14 – Concentrações de IL-10 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos.....	47

Figura 15– Controle sistemático: Médias de eventos positivos percentuais referentes à marcação de receptores TLR4 em superfície de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo.....	48
Figura 16 – Ensaio experimental: Médias de eventos positivos percentuais referentes à marcação de receptores TLR4 em superfície de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos.....	48
Figura 17 - Controle sistemático: Médias da intensidade de fluorescência por macrófago RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo.....	49
Figura 18 - Ensaio experimental: Médias da intensidade de fluorescência por macrófago RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo.....	49
Figura 19 – ilustrações obtidas mediante análises dos números absolutos de eventos positivos percentuais referentes à marcação de receptores TLR4 em superfície de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos em software Flowjo.....	50
Figura 20 - Controle sistemático: Número de células positivas no <i>gate</i> referentes à marcação de espécies reativas de oxigênio no espaço intracelular de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo.....	51
Figura 21 - Ensaio experimental: Número de células positivas no <i>gate</i> referentes à marcação de espécies reativas de oxigênio no espaço intracelular de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos.....	52
Figura 22 - Controle sistemático: Médias da intensidade de fluorescência por macrófago RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo.....	52
Figura 23 - Ensaio experimental: Médias da intensidade de fluorescência por macrófago RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo.....	53
Figura 24 – Controle sistemático: densidade ótica referente à análise da viabilidade de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada – teste MTT	54
Figura 25 – densidade ótica referente à análise da viabilidade de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos – teste MTT	54
Figura 26 - Modelo proposto de ação intra-celular da ultradiluição 15 cH de aspirina.....	63
Quadro 1 – Resumo dos resultados experimentais	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de concentrações de citocinas e quimiocinas por grupo (média \pm desvio padrão) expressos em pg/ml	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido Araquidônico

AAS – Ácido acetil-salicílico

AC – Adenilato ciclase

ADP – Adenosina Difosfato

AMP-C – Monofosfato cíclico de Adenosina

ASA 15 cH – *Acetylsalicylic Acid* 15 cH

BSA – *Bovine Serum Albumine*

CD 40L – Proteína ligante CD 40

COX-1 – Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenases 2

DE – Duração de êmbolos

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ERK $\frac{1}{2}$ - *Extra Cellular Signal Regulated Kinase*

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FAD – Dinucleotídeo Flavina Adenosina

GC – Guanilato ciclase

GMP-C – Monofosfato cíclico de Guanosina

GP – enzima Glutation Peroxidase

GP VI – Glicoproteína VI

GPIb (CD 18) – Glicoproteína Ib (Proteína CD 18)

GPIIb/IIIa – Glicoproteína IIb/IIIa

H2DCF-DA – 6-carboxi-2',7'diclorodihidrofluoresceína diacetato

H₂O – água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IκB – Proteína I *beta* Kinase

IκK – Proteína I *kappa* Kinase

IL-1 – Interleucina 1

IL-10 – Interleucina 10

IL-1β – Interleucina 1beta

IL-6 – Interleucina 6

INF-γ- Interferon gama

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

JNK – *c-junction N-Terminal Kinase*

LPS – Lipopolissacarídes

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

MFi –Median Fluorescence intensity

MMP-9 – Matriz Extracelular Metaloproteinase 9

MPR4 – *Multi-protein Resistance 4* (Proteína de resistência à drogas)

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NE – Número de êmbolos

NET – Rede extracelular de neutrófilos

NF- κB – Fator nuclear *kappa* beta

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido Nítrico

NOX – enzima NADPH-oxidase

NS-398 – Inibidor de COX-2

O₂⁻ - ânion Superóxido

O₂ - Oxigênio

OH[•] - Radical hidroxila

p38 – Proteína Kinase 38

PAF – Fator de Ativação Plaquetária

PAF-R – Receptor de Fator de Ativação Plaquetária

PBS – Tampão fosfato salino

PDE – Fosfodiesterases

PF4 – Fator Plaquetário 4

PGE₂ – Prostaglandina E2

PGI₂ – Prostaciclina E2

PkA – Proteína Kinase A

PkG – Proteína Kinase G

Rcf – força centrífuga relativa

SC-560 – Inibidor de COX-1

SOD – Superóxido dismutase

TGF-β1 – Fator de Transformação de Crescimento B1

TLR4 – *Toll-like Receptor 4*

TNF-α – Fator de necrose tecidual alfa

TXA₂ – Tromboxano A₂

αIIbβ₃ – integrina alfa II beta 3 (CD 62p)

β₂ Mac-1 – integrina beta 2 Mac I (CD 11b)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão de literatura: trombogênese e inflamação	15
1.2 <i>Cross-talk</i> entre macrófagos, plaquetas e endotélio na trombogênese.....	19
1.3 A construção de um paradoxo	23
1.4 O surgimento de hipóteses	25

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais	27
2.2. Específicos.....	27

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética	28
3.2 Preparo do medicamento e controles	28
3.3 Cultura de macrófagos.....	29
3.4 Captura de imagens e análise de espraiamento.....	31
3.5 Análise de sobrenadante	
3.5.1 Avaliação da concentração de quimiocinas e citocinas	32
3.5.2 Dosagem de Óxido nítrico	32
3.6 Análise de atividade celular	
3.6.1 Dosagem de peróxido de hidrogênio	33
3.6.2 Expressão de TLR4.....	34
3.6.3 Atividade oxidativa	35
3.6.4 Viabilidade celular	36
3.7 Análise Estatística	36

4 – RESULTADOS

4.1 Espraiamento dos macrófagos	37
4.2 Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	40

4.3	Produção de óxido nítrico (NO)	41
4.4	Quimiocinas e citocinas	
4.4.1	MCP-1	43
4.4.2	TNF- α	43
4.4.3	IL-6	45
4.4.4	IL-10	46
4.5	Expressão de TLR-4	47
4.6	Atividade oxidativa	51
4.7	Viabilidade celular	53

5 DISCUSSÃO

5.1	Os resultados observados e sua classificação	55
5.2	Propostas de explicação para o paradoxo	
5.2.1	Hipóteses biológicas	57
5.2.2	Hipóteses físico-químicas	65

6 CONCLUSÕES	70
---------------------	-----------

REFERÊNCIAS	71
--------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão de literatura: trombogênese e inflamação

Há anos são conhecidas as funções que plaquetas desempenham na geração de trombos, porém evidências do exercício de suas funções moduladoras da inflamação e da imunidade são mais recentes (KNOWLES; WARNER, 2019). O conceito atual de trombo-inflamação une processos trombogênicos, inflamatórios e imunológicos em que plaquetas são células-chaves, verdadeiras sentinelas do endotélio vascular contra injúrias inflamatórias e doenças infecciosas (GUO; RONDINA, 2019).

De tamanho muito pequeno (1,5 a 3,0 micrômetros), seu formato de disco achatado e a ausência de núcleo são avanços evolucionários em mamíferos, pois permite grande capacidade de invaginação para fagocitose e liberação de grânulos de quimiocinas e citocinas inflamatórias (LI *et al.*, 2017). As plaquetas também expressam proteínas em sua superfície como P-selectinas, amplificando a atividade de neutrófilos (PIRCHEP *et al.*, 2019) e receptores do tipo *Toll-like receptors* (TLR4) que, na presença de Lipopolissacarides (LPS) da membrana de bactérias Gram negativas, ativam e polarizam o perfil inflamatório M1 de macrófagos (CARESTIA *et al.*, 2019), o que potencializa a trombogênese.

Sob ambiente inflamatório vascular, estímulos oriundos de colágeno endotelial e de moléculas como LPS, Fator de Ativação Plaquetária (FAP), trombina e Adenosina Difosfato (ADP) iniciam a cascata de inflamação nas plaquetas (NAYAK *et al.*, 2014). O ácido araquidônico (AA) é gerado pela clivagem de fosfolípidos de membrana, enquanto a síntese de ciclooxigenase-2 (COX-2) é induzida, dando origem a prostaglandinas e tromboxanas (PGE₂, PGI₂ e TXA₂), que são mediadores inflamatórios com ações diversas na trombogênese (RUKOYATKINA *et al.*, 2018).

A cascata de coagulação também é ativada e, em conjunto com seus fatores como trombina e fibrinogênio, há a deposição de fibras insolúveis que visam garantir estabilidade e aderência das plaquetas ao trombo em crescimento como a actina e fibrina (KNOWLES; WARNER, 2018). Ativadas, as plaquetas superexpressam receptores glicoprotéicos GPIIb/IIIa em sua superfície, ativando outras plaquetas e permitirá a sua ligação com fibrinogênio, favorecendo o agregado plaquetário

(CASTRO *et al.*, 2006). O citoesqueleto plaquetário passa, então, por transformações externas, adquirindo um formato alongado devido ao necessário espreadimento para o estabelecimento da trombogênese (STOCKER *et al.*, 2018) e também internas, com nova regulação na polimerização de actina e reordenação das lamelipódia, filopódia e fibras de tensão (YUSUF *et al.*, 2017). A trombina influencia a produção endotelial de PGI₂ e também origina fibrina, essencial para a formação da estrutura do trombo (JENNINGS, 2009).

A ligação estável de plaquetas com células endoteliais contribui para a manutenção da integridade do endotélio vascular. Durante a instalação de um processo inflamatório trombótico com exposição da matriz extracelular, além da sinalização de plaquetas ativadas para um contato direto (célula-célula) com células inflamatórias como neutrófilos, linfócitos T, células dendríticas, monócitos e macrófagos, há também a agregação local de células musculares lisas, proteínas de matriz extracelular, lipídios e cálcio (LUQUE *et al.*, 2018).

PAF (fator ativador de plaquetas) é um mediador inflamatório oriundo da ativação de Fosfolipase A2 na membrana e é produzido por diversas células (SILVA JR., 2017). Em concentrações subnanomolares (10^{-9} a 10^{-12} M), sua ligação a receptores PAF-R específicos na superfície de monócitos, macrófagos, linfócitos, plaquetas, células endoteliais e até tumorais, desencadeia ações que são secundárias à sinalização intracelular de fosfolipases A2 e C e de enzimas *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), como agregação plaquetária, quimiotaxia, aumento da permeabilidade vascular e estresse oxidativo (ABHILASHA *et al.*, 2019).

O estímulo plaquetário é expresso pela liberação de seus grânulos com potencial inflamatório. Nos macrófagos, a expressão de receptores TXA₂ amplifica o perfil macrófágico M1 (PIERRE *et al.*, 2016). Esse fenótipo também permite ao macrófago uma ação regulatória na expressão de fatores teciduais e da matriz extracelular metaloproteinase 9 (MMP-9), relacionada com a ruptura da placa aterosclerótica (ZHANG *et al.*, 2017).

No trombo, o status de ativação das plaquetas no microambiente da lesão vascular é determinado pelo balanço entre sinalizações ativadoras da matriz extracelular e inibidoras, como a constante presença endotelial de óxido nítrico (NO) e PGI₂, potentes vasodilatadores, que impedem a adesão plaquetária ao endotélio

(YUSUF *et al.*, 2017). Assim como este balanço é determinante no desenvolvimento de trombogênese ou hemorragia, a estrutura trombótica também deve ser entendida, sendo seu centro a principal área de estimulação por trombina; e sua periferia, suscetível a sinalizações excitatórias oriundas de fibrinogênio, ADP e TXA₂ (ATKINSON *et al.*, 2018).

Estímulos tanto plaquetários quanto de patógenos induzem a produção de COX-2 nos macrófagos e a consequente ativação do Fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (LIU *et al.*, 2017a). Como células imunitárias inatas, a ação macrofágica vai além da fagocitose de micro-organismos e moléculas mediante a ativação dessa via, que se revela pela liberação de mediadores como Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-10 (IL-10), atuantes no processo inflamatório (JAYAKUMAR *et al.*, 2020) e na indução de enzimas como a óxido nítrico sintase (iNOS), responsável pela liberação de NO (CAILLOT *et al.*, 2018).

O NO é um radical livre gasoso, produzido a partir do aminoácido L-arginina e com funções fisiológicas em concentrações adequadas como neurotransmissão e a vasodilatação do endotélio (VUONG *et al.*, 2019). Em condições inflamatórias, a superexpressão de iNOS eleva sua concentração intracelular, favorecendo a ação citolítica do macrófago (LEE *et al.*, 2016). Porém, uma produção massiva de NO devido à inflamação aguda excessiva ou mesmo crônica está relacionada com danos teciduais irreversíveis, falência de órgãos ou mesmo morte (MARQUES *et al.*, 2019).

O NO parece ainda sofrer um controle regulatório de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), mais precisamente da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (GUNAWARDENA *et al.*, 2019). O “burnst respiratório” que culmina na produção do ânion superóxido (O₂⁻), tem início na oxidação de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) pela enzima NOX (NADPH-oxidase) A ação da enzima superóxido dismutase (SOD) é então fundamental na regulação do estresse oxidativo celular, evitando a formação de outras ERO como radicais hidroxilas (OH⁻) e transformando O₂⁻ em H₂O₂ (ZENG *et al.*, 2018).

Em condições normais, esse H₂O₂ sofre ação da enzima catalase e é convertido em água (H₂O) e oxigênio (O₂). Em quantidade excessiva, essa molécula de H₂O₂ é capaz de alterar o potencial de membranas celulares (WU *et al.*, 2014) e induzir sinalização pró-inflamatória como a produção de radicais OH⁻, apoptose de células

vasculares com dano endotelial favorecendo a instalação de placas ateroscleróticas e infiltração de monócitos e macrófagos mediante sua ativação pela via MAPK (GIACOPPO *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017b). MAPK são proteínas kinases que ativam vias celulares relacionadas a diversos processos como proliferação, diferenciação, motilidade, sobrevivência e morte celular (LIU *et al.*, 2017b). A presença de TNF- α pode ativar diferentes vias dessa proteína como a p38 MAPK (ZHANG *et al.*, 2017), responsável por um *feedback* positivo que eleva as concentrações de ERO via estímulo da enzima NOX.

A interação plaquetas-monócitos está no centro de uma relação entre inflamação e trombose e as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de inflamação endotelial crônica (DIXON *et al.*, 2006), e a oclusão arterial causada pela ruptura de um trombo é a principal causa de derrames e infarto do miocárdio e, conseqüentemente, de mortes em paciente com doenças coronarianas (PIRCHER *et al.*, 2019).

A terapia antiplaquetária vem sendo preconizada há décadas e a Aspirina é uma das drogas mundialmente mais utilizadas por seres humanos. Sua prescrição tem base em seu mecanismo de ação, que diminui sensivelmente o risco da formação de trombos vasculares (VIANNA *et al.*, 2012; SUTCLIFFE *et al.*, 2013), acidente vascular cerebral e recidivas de infarto do miocárdio (ZHANG *et al.*, 2017).

Por meio de acetilação da posição 529 da porção serina da ciclooxygenase-1 (COX-1), a Aspirina inibe essa enzima constitutiva e a conseqüente geração de TXA₂, (FLOYD, FERRO, 2015) durante o período médio de vida plaquetária que é de 7 a 10 dias (LEE *et al.*, 2016). A Aspirina também pode inibir irreversivelmente a porção serina 512 de COX-2, enzima induzida por processos inflamatórios em células endoteliais. Porém, a Aspirina é em torno de 100 vezes mais potente na inibição de COX-1 (SILVA, 2014).

O efeito antitrombótico prolongado da Aspirina depende da concentração da droga e da biodisponibilidade de seu metabólito ativo, o ácido acetilsalicílico (AAS). Pequenas doses de Aspirina (1 mg/kg) já são suficientes para ação antiplaquetária como o bloqueio irreversível da produção de TXA₂, mas sem a inativação permanente de COX-1. Para o alcance da inibição endotelial de PGI₂, doses maiores e com caráter anti-inflamatório são necessárias (LICHTENBERGER *et al.*, 2017), porém eleva-se

também os riscos de possíveis efeitos adversos devido à perda do efeito protetor de PGE₂ em mucosas (MCLEWEE *et al.*, 2017), como hemorragias no encéfalo, na mucosa gastrointestinal e no trato respiratório (MCNEIL *et al.*, 2018).

Mesmo com a terapia antiplaquetária da Aspirina, muitos pacientes continuam sujeitos à neoformação de trombos, em um fenômeno caracterizado como resistência à Aspirina (ABACI; KILICKESMEZ, 2013; PETERSEN *et al.*, 2015; FLOYD; FERRO, 2015; YASSIN *et al.*, 2018). Uma interrupção abrupta ou inapropriada do tratamento também pode culminar em eventos protrombóticos associados à síndrome de abstinência (GERSTEIN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2014).

Em uma meta-análise, Burger *et al.* (2005) descreveram a abstinência de Aspirina como responsável por 10,2% das síndromes cardiovasculares agudas. Rukoyatkina *et al.* (2018) citaram anormalidades na resposta à Aspirina em aproximadamente 25% dos pacientes com doença cardiovascular, que fazem uso contínuo da droga.

1.2 Cross-talk entre macrófagos, plaquetas e endotélio na trombogênese

Atualmente é fato que há uma variabilidade individual e significativa na resposta plaquetária de pacientes com síndromes cardiovasculares que recebem terapia antitrombogênica (KASMERIDIS *et al.*, 2013). O retorno funcional de plaquetas, mesmo sob a suposta inibição irreversível da Aspirina é caracterizado por alguns autores como efeito rebote (EISENBERG *et al.*, 2009; LORDKIPANIDZÉ *et al.*, 2009; ALCOCK *et al.*, 2014).

Tais eventos podem ser justificados mediante variações farmacocinéticas como a absorção do fármaco, o metabolismo da célula e a biodisponibilidade da droga (FLOYD; FERRO, 2014; HAINES *et al.*, 2019). Variações farmacodinâmicas também podem coexistir, por exemplo: a proteína de resistência multidrogas 4 (MPR4), transportadora de nucleotídeos, é superexpressa em plaquetas tratadas com Aspirina, causando o efluxo celular da droga e a diminuição de sua ação (FLOYD; FERRO, 2015). SANTILLI *et al.* (2009) demonstraram a não-linearidade da relação entre o bloqueio da produção de TXA₂ plaquetário e a geração de trombos em indivíduos saudáveis, sugerindo uma rápida reconstituição dessa via plaquetária, ou mesmo outro mecanismo ainda desconhecido. O polimorfismo de receptores plaquetários

envolvidos na agregação plaquetária, como GPIIb/IIIa pode induzir alterações farmacocinéticas na absorção da droga, sendo descrito como uma das causas de efeito rebote à administração de Aspirina (ABACI; KILICKESMEZ, 2013; KASMERIDIS *et al.*, 2013; FLOYD; FERRO, 2014).

Em locais de injúria tecidual ou mesmo em infecções, as plaquetas são as primeiras células recrutadas pelo endotélio vascular, onde podem interagir com diversas células como monócitos e macrófagos, mediante contato direto ou liberação de seus grânulos (PIERRE *et al.*, 2016).

Por sua vez, macrófagos são células amplamente empregadas em pesquisas com modelos de inflamação, já que estão presentes em todos os tecidos corpóreos e possuem uma plasticidade fenotípica caracterizada como essencial em processos inflamatórios e reparo tecidual (ATRI *et al.*, 2018). São as células mais dinâmicas e versáteis envolvidas no processo de homeostase por meio do sistema imune inato e no estabelecimento da inflamação (LIU *et al.*, 2017c). São células capazes de alterar seu metabolismo conforme o meio em que se encontram, podendo assumir postura ativa contra patógenos mediante maior exposição de receptores TLR4 ou mesmo atuar na reparação tecidual via fosforilação oxidativa mitocondrial e maior consumo de ácidos graxos (ARTYOMOV *et al.*, 2016).

Incitado por LPS, o perfil macrofágico M1 tem na ativação da clássica via NF- κ B os caminhos necessários para a sua proatividade inflamatória e geração de ERO e NO, via processo glicolítico. O desenvolvimento de placas ateroscleróticas em endotélios inflamados conta sobretudo com a íntima relação de macrófagos e plaquetas, além de células dendríticas e musculares lisas, linfócitos, matriz extracelular, lipídios e cálcio (LUQUE *et al.*, 2018). A migração plaquetária para sítios externos ao endotélio parece ser inclusive dependente das células do sistema imune (PIERRE *et al.*, 2016).

As células endoteliais secretam mediadores que agem sinergicamente para reduzir a excitabilidade das plaquetas, como o NO que estimula a produção de GMP-c (Monofosfato cíclico de Guanosina) e a PGI₂ que favorece a liberação de AMP-c (Monofosfato cíclico de Adenosina). Esses nucleotídeos cíclicos, por meio de suas respectivas proteínas quinases (PKG e PKA), são as principais vias de inativação da atividade inflamatória plaquetária (KNOWLES; WARNER, 2019), podendo determinar

a fosforilação de proteínas ligadas ao cálcio, externalização de integrinas e remodelamento do citoesqueleto (ATKINSON *et al.*, 2018) porém, elas podem ser rapidamente removidas do microambiente por enzimas fosfodiesterases (PDE) em função do contexto. Há uma sintonia fina e multifatorial, que determina a atividade dessas células (RUKOYATKINA *et al.*, 2018), por exemplo, a concentração de PGE₂ no microambiente vascular pode tanto inibir quanto amplificar a resposta plaquetária. A prostaciclina PGI₂, conhecida por reduzir o estresse plaquetário (YUSUF *et al.*, 2017), pode reduzir a ativação de AMP-c de plaquetas e favorecer o retorno de seu potencial inflamatório, quando há inibição endotelial via COX-2 pela Aspirina (KNOWLES; WARNER, 2019).

As células endoteliais também reestabelecem a síntese de COX-1 durante o processo inflamatório e novas plaquetas surgem após dois dias, em média, a partir da inativação pela Aspirina (PETTERSEN *et al.*, 2015). Também, a origem de plaquetas a partir dos megacariócitos na medula envolve a participação de ciclooxigenases, e COX-2 é superexpressa no estágio final de diferenciação. Tal processo é descrito na resposta compensatória de megacariócitos no baço, originando plaquetas altamente reativas e com grande capacidade trombogênica, conforme descrito por BARBIERI *et al.* (2015), que basearam suas conclusões em experimentos realizados em ratos *knockout* COX-2, que não produziam prostanóides inflamatórios.

A molécula do ácido acetilsalicílico tem predileção pela inativação da enzima constitutiva COX-1 e de seu metabólito ativo TXA₂, e doses consideradas baixas de Aspirina (100 a 200 mg/paciente/dia) são rotineiramente preconizadas para o tratamento de doenças cardiovasculares (LUCOTTI *et al.*, 2019). Tais doses possuem meia-vida curta e capacidade inibitória sobre o TXA₂ plaquetário muito maior do que a inibição de prostaciclina (PETTERSEN *et al.*, 2015). Não obstante, os fenômenos envolvendo alta reatividade plaquetária ocorrem em casos agudos de inflamação endotelial e de pacientes justamente sob essas doses, que necessitam ser elevadas para 500 mg/dia/paciente (DRACOULAKIS *et al.*, 2018), com caráter anti-inflamatório e capaz de inibir também a indução de COX-2.

A presença do receptor TLR4 na superfície de plaquetas é fundamental para o início da relação com monócitos e macrófagos. Por intermédio de sinalizações intracelulares via GMP-c e PKG, baixas concentrações de LPS parecem favorecer a

expressão do ligante P-selectina, atraindo essas células ao endotélio (LI *et al.*, 2017; GUO; RONDINA, 2019). Maiores concentrações também fariam as plaquetas expressarem mediadores como TNF- α , FAP, PF4 (fator plaquetário 4), e receptores como CD40L, glicoproteína GPIb (CD 18), integrina α IIb β 3 (CD 62P), além de TXA₂ e seu receptor específico (CARESTIA *et al.*, 2019).

A oxidação de lipoproteínas de baixa densidade LDL (Low Density Lipoprotein), resultante de disfunção endotelial das camadas íntima e sub-íntima de vasos, aumenta a inflamação e a produção de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio) e citocinas por macrófagos (LUQUE *et al.*, 2018). A ativação plaquetária por LPS e a subsequente síntese de TXA₂ estimulam a expressão de receptores desse eicosanóide em macrófagos, porém independente da liberação de TXA₂, é o contato inicial plaqueta-macrófago, mediado entre o ligante CD62P na plaqueta e o receptor macrofágico GP-I (P-selectina *glycoprotein ligand I*), que parece ser determinante na polarização do fenótipo M1 pelo macrófago e na degranulação plaquetária (PIERRE *et al.*, 2016) de elementos como ADP, quimiocinas, TNF- α , NO, fatores de coagulação como a trombina e mais TXA₂ para ativação de outros trombócitos (LI *et al.*, 2017).

A conexão entre o ligante CD18 na plaqueta e a integrina β 2 Mac-1 (CD11b) no macrófago é então decisiva no exercício de atividades pró-inflamatórias por meio da liberação de citocinas como IL-1 β , IL-6, COX-2 e PGE₂ pelos fagócitos (GUO; RONDINA, 2019). As plaquetas em ligação com macrófagos ainda são capazes de responder ao estímulo subendotelial de colágeno, quando migram para fora do endotélio via receptor GPVI (glicoproteína VI receptora de colágeno) culminando em maior produção de TXA₂ e expressão de seus receptores, além de estimular os macrófagos na liberação de mais citocinas, em um processo de retroalimentação via *feedback* positivo de TXA₂ (PIERRE *et al.*, 2016). A integrina CD 62P nas plaquetas é ainda responsável pela formação da rede extracelular de neutrófilos e hemácias, caracterizada como NET (Neutrophil Extracellular Trap) (GUO; RONDINA, 2019). Carestia *et al.* (2016) demonstraram *in vitro* que plaquetas pré-tratadas com AAS e impossibilitadas de gerar TXA₂ eram incapazes também de gerar metabólitos estimuladores de neutrófilos, como PF4 e vWF (fator de von Willebrand), após serem desafiadas com LPS e AA. Porém, o estudo também demonstrou que essas mesmas

plaquetas eram capazes de gerar NET contra patógenos, quando estimuladas com altas doses de trombina.

A comunicação entre plaquetas e macrófagos não ocorre apenas via contato direto entre as partes. A liberação de fatores solúveis plaquetários por meio de vesículas extra-celulares está condicionada à intensidade do processo inflamatório e tem a capacidade de regular a polarização do fenótipo macrofágico, estimulando a capacidade fagocítica em células humanas, por exemplo (LAFFONT *et al.*, 2016). ANDO *et al.* (2016), por sua vez, demonstraram a atenuação dos efeitos do estímulo por LPS com consequente inibição da produção de NO, TNF- α , e IL-6 via NF- κ B em macrófagos murinos oriundos de medula óssea e co-cultivados com plaquetas estimuladas por trombina, exemplificando que processos de trombocitopenia podem ser fatais em quadros de choque séptico.

Além do impulso plaquetário, o fenótipo M1 de macrófagos pode ser induzido por citocinas como TNF- α , INF- γ , ou pelo reconhecimento de LPS da membrana de bactérias Gram negativas por seus receptores TLR4 (KOTWAL; CHIEN, 2017). Com grande síntese de TNF- α e NO, o perfil M1 também se caracteriza pela capacidade de atuar tanto em microambientes que tenham gradiente de oxigênio, quanto em situações de hipóxia, em que ativa seu sistema de glicólise (MOGHADDAM *et al.*, 2018). Sua morfologia também é alterada, de forma que possibilite grande capacidade fagocítica. Em comparação ao perfil macrofágico M2 e a despeito da preservação da fagocitose, há perda da capacidade endocítica (ATRI *et al.*, 2018).

1.3 A construção de um paradoxo

Estudos pioneiros em que a suposta linearidade trombótica dose-dependente da Aspirina foi arguida tiveram início na década de 1980. Doutremepuich e colaboradores (1987a; 1987b) observaram que a ingestão oral de uma dose inferior a 1mg de ácido acetilsalicílico era capaz de reduzir temporariamente o tempo de sangramento em pessoas.

O entendimento da ação de doses cada vez menores da Aspirina gerou, no início da década de 1990, as primeiras menções a uma ultradiluição da droga. Entende-se como ultradiluição a preparação homeopática de uma substância em que

diluições sucessivas, na proporção 1:100, são seguidas de 100 sucussões (agitações verticais) a cada etapa. Esse é o princípio farmacotécnico da homeopatia.

A adição *in vitro* de plaquetas de indivíduos saudáveis em meio incubado com fragmentos de tecido aorto-coronariano, reduziu de forma considerável a agregação das células. Esse efeito foi revertido pela Aspirina ultradiluída quando a mesma foi incubada em conjunto com o fragmento tecidual, elevando concentrações de trombina e indicando uma possível ação de diluições de Aspirina no endotélio de vasos (DOUTREMEPUICH *et al.*, 1990). Uma única administração subcutânea de Aspirina 100 mg/kg impediu a geração de trombos, após inflamação por raios laser em arteríolas intestinais de ratos até o sétimo dia, quando uma neoformação de trombos vasculares se intensificou de forma significativa (AGUEJOUF *et al.*, 1998).

Em modelo experimental similar, Belougne-Malfati *et al.* (1998) investigaram a ação conjunta de aplicações subcutâneas de Aspirina cH 30 e 100 mg/kg em trombose induzida em ratos: o efeito antiagregante da maior concentração era contraposto pela ultradiluição, sendo o resultado final um equilíbrio desses efeitos que tendia à trombogênese, diminuindo o tempo de sangramento das cobaias *in vivo*. A ultradiluição de Aspirina, que também promoveu agregação plaquetária *in vitro*, poderia ter modificado a resposta endotelial.

O caráter protrombótico da ultradiluição de Aspirina cH 15, potência com maior evidência trombogênica observada nas pesquisas, foi avaliado mediante emprego de indometacina (inibidor não-específico de COX), utilizando modelo de hipertensão portal em ratos (EIZAYAGA *et al.*, 2005). A indometacina causou diminuições tanto no número (NE) quanto na duração (DE) dos êmbolos microvasculares, provavelmente pelo bloqueio da geração de TXA₂ nas plaquetas e PGI₂ endotelial, o que era prontamente revertido após o emprego da ultradiluição de Aspirina. Mesmo a indometacina tendo uma ação anti-agregante, o efeito da ultradiluição de Aspirina foi potencializado quando as mesmas foram utilizadas em conjunto nas amostras que envolveram a inflamação vascular via raio laser, elevando ainda mais NE e DE. Surgiam, então, hipóteses de que modificações nas vias enzimáticas da inflamação poderiam estar relacionadas aos efeitos da ultradiluição.

1.4 O surgimento de hipóteses

Doutremepuich *et al.* (2007) avaliaram as relações das ciclooxigenases com seus inibidores específicos (SC-560 para COX-1 e NS-398 para COX-2) e suas possíveis interações com a Aspirina ultradiluída *in vivo*. A antitrombogênese causada pela inibição de COX-1 era antagonizada pelo efeito protrombótico da Aspirina 15 cH. A inibição conjunta de COX-1 e COX-2 também apresentou efeito trombolítico que novamente foi revertido pela Aspirina ultradiluída. Já a prévia administração isolada de NS-398 elevou NE e DE, em efeito similar ao emprego da ultradiluição isolada. Porém, a administração conjunta de NS-398 e Aspirina 15 cH não apresentou efeito algum, como se anulasse uma à outra. Os mesmos resultados foram apresentados por Eizayaga *et al.* (2006; 2007) e Doutremepuich *et al.*, (2010)., reforçando a participação de COX-2 na geração de trombos e sugerindo que a enzima e a ultradiluição deflagrariam um processo de auto-regulação.

A ultradiluição de Aspirina parece não afetar a geração de TXA₂ plaquetário via COX-1, levando a crer que a geração de efeitos protrombóticos possa ter relação específica com a via de COX-2 (DOUTREMEPUICH *et al.*, 2007). Doutremepuich *et al.* (2010) ratificaram a hipótese do balanço entre as ciclooxigenases e as ultradiluições de Aspirina na trombogênese, em estudo que envolveu a participação de 1.000 animais. Entretanto, se a enzima e a Aspirina 15 cH competem entre si, o bloqueio de COX-2 por NS-398 foi insuficiente para conter o efeito protrombótico da Aspirina ultradiluída. Além disso, considerando que a inibição de COX-2 e a adição de Aspirina 15 cH anulam a ação trombogênica uma da outra e a inibição de COX-1 em associação à Aspirina 15 cH obteve grande ação pró-trombótica, deve existir o envolvimento de outro mecanismo, endotelial ou não, relacionado à atividade de COX-2 na trombogênese e que poderia explicar tal efeito paradoxal.

Dado que Hermansson *et al.* (2014) descreveram a ação pró-trombótica de macrófagos ativados por LPS e sua possível associação com risco aumentado de trombose e desenvolvimento de aterosclerose, a relação de plaquetas com macrófagos (e de outras vias possíveis de ativação do fagócito) também devem ser consideradas nessa regulação.

Doutremepuich *et al.* (2010; 2012) atestaram a anulação dos efeitos antitrombóticos de altas doses de Aspirina (100 mg/kg), quando administradas em

conjunto com Aspirina 15 cH, além da confirmação de que uma única dose de Aspirina 100 mg/kg tem um efeito rebote trombogênico em torno de oito a dez dias. Esse mesmo efeito trombogênico pode ser obtido por meio do emprego de Aspirina 15 cH em apenas uma hora, em um mecanismo que envolve a inibição de COX-2 (DOUTREMEPUICH *et al.*, 2013).

Esse aparente efeito paradoxal se enquadra no conceito clássico de similitude, conforme as bases teóricas da homeopatia, uma vez que a Aspirina ultradiluída pôde neutralizar os efeitos da mesma em doses maiores (TEIXEIRA, 2008). Especula-se, porém, que estas soluções ultradiluídas necessitam de um caráter molecular organizacional (Takahashi *et al.*, 2007) e ressonante para transmitir a informação medicamentosa, conforme postulado pela teoria dos domínios de coerência (Montagnier *et al.*, 2015). Dessa forma, o emprego de soluções cujo preparo envolveu a aplicação de correntes elétricas pode ajudar a confirmar tal teoria.

Portanto, variações na concentração de Aspirina permitem atividades biológicas distintas, mas diluições acima do número de Avogadro têm a capacidade de reverter os efeitos antitrombóticos das altas doses. A busca da relação entre os diversos fatores envolvidos na tromboinflamação com a Aspirina 15 cH pode ajudar a esclarecer não apenas a questão do efeito rebote, mas também obter um melhor conhecimento do envolvimento de COX-2 nesse mecanismo conforme observado em estudos prévios. Nesse sentido, justifica-se o envolvimento de macrófagos e suas possíveis vias de ativação. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da Aspirina 15 cH em culturas de macrófagos RAW 264.7, estimuladas por LPS (uma substância ativadora de COX-2) na ativação celular (*spreading*), expressão de citocinas, NO, H₂O₂, expressão de receptores TLR4 e atividade oxidativa via identificação por sonda fluorimétrica. A identificação de eventuais parâmetros físico-químicos da Aspirina 15 cH, que contribuam com a identificação dos mecanismos de ação envolvidos na ativação macrofágica será objeto da próxima fase deste estudo. O modelo experimental utilizado foi a cultura de macrófagos RAW 264.7, em meio R10, ativado com LPS nas concentrações de 1 µg/ml (LIU *et al.*, 2017a).

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar os efeitos de Aspirina 15 cH sobre a atividade bioquímica e morfológica de macrófagos da linhagem RAW 264.7, com ou sem a estimulação por LPS.

2.2 Específicos

Avaliar parâmetros da atividade macrofágica como:

- espraçamento
- produção de óxido nítrico
- produção de peróxido de hidrogênio
- produção de citocinas e quimiocinas
- atividade oxidativa celular (sonda H₂DCF-DA)
- viabilidade celular (atividade mitocondrial)
- expressão de receptores TLR4.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética

Por se tratar de estudo 100% *in vitro*, utilizando células da linhagem RAW 264.7, a aprovação do comitê de ética da UNIP para uso de animais em pesquisa não foi necessária. Declara-se, portanto que este projeto não envolve o uso de animais.

3.2 Preparo do medicamento e controles

A água utilizada nos experimentos foi obtida mediante filtração em membrana por meio de processo de osmose reversa em equipamento com sistema Milli-Q, sendo denominada água ultrapura tipo I. A ultradiluição 14 cH (Centesimal Hahnemaniana) de ácido acetilsalicílico, nomeada de Aspirina 14 cH, foi obtida em Farmácia credenciada na ANVISA na forma de matriz, preparada em solução hidro-alcoólica 30%. A diluição de trabalho (ASA 15 cH) foi feita na véspera dos ensaios, em condições estéreis, na proporção 1:100. A 9900 µl de água ultrapura tipo I, esterilizada e filtrada em microfiltros para seringa de 22 micrômetros, foram acrescentados 100 µl de Aspirina 14 cH, sendo a mistura imediatamente sucussionada verticalmente por 100 vezes em aparelho dinamizador modelo Denise (Autic®), sendo este procedimento parte da técnica prevista na Farmacopéia Homeopática Brasileira - 3ª edição (2011). Também na véspera, foram preparados 10 ml dos controles: “água sucussionada”, sendo esta uma água ultrapura tipo I processada no automatizador para um único ciclo de agitação de 100 vezes, e “água pura”, sem dinamização, ambas estéreis.

Na segunda série de experimentos, um frasco adicional de Aspirina 15 cH foi preparado e destinado ao controle EF (*Electric Flow*), para a pesquisa da influência que correntes elétricas de baixa amperagem (10 pulsos de 30 µA) poderiam causar na polaridade das moléculas de água presentes no medicamento e, portanto, uma das formas mais simples de se identificar variações no comportamento dipolo do veículo. Dentro de cabine de fluxo laminar, as amostras dos medicamentos foram transferidas para um criotubo de fundo reto e os eletrodos inseridos em paralelo, com o cuidado de se evitar o contato entre os mesmos. O aparelho foi estabilizado com o contato entre seus eletrodos tipo garra em 200 mV e a amostra foi submetida a um amperímetro de alta sensibilidade (Ryodoraku, Brasil), capaz de produzir uma corrente contínua de 1 a 200 microampères entre seus dois eletrodos, a uma tensão

de 12V. Os eletrodos foram fixados em uma base de cera isolante e 10 pulsos de 3 segundos foram aplicados no líquido (Bonamin et al., 2019).

O ácido acetilsalicílico utilizado como controle positivo foi fornecido pela mesma farmácia designada para o preparo da matriz medicamentosa 14 cH, sendo a mesma matéria prima. Assim, 6 mg foram diluídos em 1000 µl de solução RPMI, de forma que, após sua adição aos poços de cultura, obteve-se uma concentração final de ácido acetilsalicílico de 200 µg/ml (Belhassena et al., 2020).

O LPS (Sigma-Aldrich, USA) foi ressuspenso em água estéril para obtenção de uma solução estoque a 20%, alíquotada em frações de 10 µl e posteriormente acondicionadas em freezer -20°C. No início dos experimentos, as amostras de uso eram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas em 1990 µl de solução RPMI, resultando em uma solução 1 µg/ml de LPS.

A fim de garantir a reprodutibilidade das análises, todos os frascos de vidro foram esterilizados e todos os medicamentos e controles filtrados em microfiltros para seringas de malha de 0,22 µm (Kasvi®, Brasil).

3.3 Cultura de macrófagos

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 (amostras padronizadas) foram mantidos em freezer a -80°C e as amostras de trabalho foram descongeladas e prontamente diluídas em 1,0 ml de solução RPMI-1640 (Gibco – Thermofisher, USA), acondicionadas em tubo Falcon P, centrifugadas em uma velocidade de 1500 RPM por 5 minutos (centrífuga Hettich 32A, Alemanha) distribuídas em garrafas de cultura com solução de RPMI-1640 enriquecida com 10% de soro fetal bovino (Cutilab®, Brasil) e incubadas a 37°C com 5% CO₂ até a adesão das células ao fundo da garrafa. As garrafas foram observadas diariamente e seus meios de cultura trocados sempre conforme sua cor dentro das garrafas e a confluência celular de aderência nas mesmas. Os repiques foram feitos quando a confluência celular chegava a 80-90%, com a utilização de *cell scraper* (Kasvi®, Brasil). Antes do plaqueamento, todas as células de todas as garrafas (mesma passagem) foram transferidas a um tubo Falcon G, permitindo o cálculo da concentração necessária de células para o experimento (9 tratamentos x 6 poços = 54 poços) conjuntamente com a quantificação da porcentagem de células vivas mediante aparelho COUNTESS® (Thermofisher, USA)

por meio da adição de 100 µL da amostra da solução de células à outros 100 µL de solução 4% de azul de tripan, sendo utilizadas apenas culturas com pelo menos 85% de células vivas. Para a realização dos ensaios, as células foram acondicionadas em placas de 24 poços (5×10^5 células por poço \times 54 = total de $2,7 \times 10^7$ células por experimento), com lamínulas previamente inseridas no fundo. O volume total de meio de cultura e tratamentos foi de 300 µl por poço e as placas foram incubadas por 24 horas até a fixação das células com metanol absoluto e colheita do sobrenadante para congelamento e posterior análise de citocinas e NO. As culturas realizadas para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram transferidas para placas de 96 poços (ver item 3.5.3). Todas as dosagens foram realizadas em sextuplicata. Os diversos controles estabelecidos, assim como os volumes e concentrações, são variações dos desafios entre LPS e Aspirina 15 cH e LPS e água sucussionada, o que impediu o processo de duplo cego nas análises sistematizadas como de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, por exemplo. Em processos não-sistematizados, como o espriamento dos macrófagos, o método de cegamento das amostras foi adotado, reduzindo o viés das análises. Os grupos e desafios foram testados em paralelo, mas avaliados estatisticamente em dois blocos, para melhor evidenciação dos efeitos específicos da Aspirina 15 cH e distinção dos efeitos inespecíficos da diluição do meio em si e da água sucussionada. São eles:

Bloco A – Controle sistemático

- **Grupo LPS:** 30 µl LPS + 270 µl meio R10
- **Grupo LPS + água:** 30 µl LPS + 10 µl água + 260 µl meio R10
- **Grupo LPS + água sucussionada:** 30 µl de LPS + 10 µl água sucussionada + 260 µl de meio R10
- **Grupo água succussionada:** 10 µl água sucussionada + 290 µl meio R10

Bloco B – Ensaio experimental

- **Grupo não-desafiado:** 300 µl meio R10
- **Grupo água succussionada:** 10 µl água sucussionada + 290 µl meio R10.
- **Grupo LPS:** 30 µl LPS + 270 µl meio R10
- **Grupo Aspirina 15 cH:** 10 µl ASA 15 cH + 290 µl meio R10

- **Grupo LPS + Aspirina 15 cH:** 30 µl LPS + 10 µl ASA 15 cH + 260 µl meio R10
- **Grupo LPS + Aspirina 15 cH – EF:** 30 µl LPS + 10 µl ASA 15 Ch + 260 µl de meio R10 + EF (fluxo de corrente elétrica)
- **Grupo LPS + água sucussionada:** 30 µl de LPS + 10 µl água sucussionada + 260 µl de meio R10
- **Grupo LPS + Aspirina 200 µg/ml:** 30 µl de LPS + 10 µl Aspirina (200 µg/ml) + 260 µl meio R10

Após a coleta dos sobrenadantes, as lamínulas foram fixadas com metanol absoluto por 2 horas e as placas foram congeladas em freezer -20°C, para posterior coloração e análise de imagens.

3.4 Captura de imagens e análise de espraiamento

Uma das análises da atividade celular foi por meio da avaliação do espraiamento (*spreading*). As placas foram descongeladas e as células aderidas às lamínulas foram coradas com Giemsa em processo que envolveu uma passagem em solução de ácido acético 0,5%, 3 passagens por álcool absoluto e outras 3 por solução de xilol. As lamínulas eram, então, fixadas com 1 gota de Entellan® com sua superfície voltada para a lâmina.

Para cada lamínula foram fotografados 20 campos microscópios (Figura 1) em fotomicroscópio Nikon E200 acoplado à câmera Coolpixe monitor de LCD (NIKON, Japão). Por meio de um aumento de objetiva de 1000 x, cada imagem foi avaliada quanto à área média dos macrófagos (*spreading*), expressa em pixels, em sistema automatizado por meio do software *Metamorphoff line* (Molecular Devices, USA). Assim, cada poço gerou 20 imagens. Cada experimento, em sextuplicata, deu origem a 120 imagens. Em um total de 9 testes, foram realizados 2 experimentos em sextuplicata em um total de 1.080 imagens por experimento.

A média da área de cada imagem foi obtida pelo software. O resultado de cada lamínula (média de 20 imagens) gerou um *datapoint*, de forma que cada grupo obteve 6 *datapoints* (um para cada lamínula). A fim de se evitar um possível viés na análise morfológica dos macrófagos, esse procedimento foi realizado em cego.

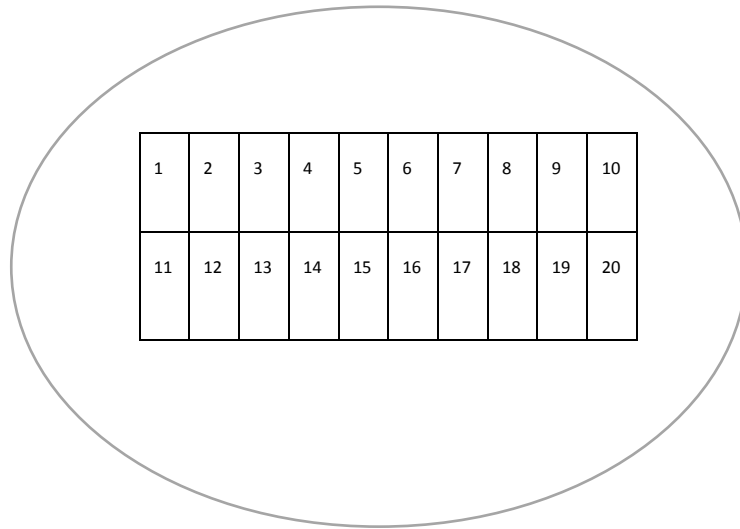


Figura 1 – Esquema representativo das 20 imagens capturadas por lamínula

3.5 Análise de sobrenadante

Com base na inter-relação plaquetas-macrófagos no endotélio inflamado de vasos e na secreção de mediadores inflamatórios por esses fagócitos, procedeu-se a dosagem de mediadores químicos do sobrenadante a partir de amostras congeladas em freezer -80°C .

3.5.1 Avaliação da concentração de quimiocinas e citocinas

Os sobrenadantes foram previamente descongelados em temperatura ambiente por 2 horas e levados à microcentrífuga em 1500 rpm (Hettich 32A, Alemanha) por 5 minutos. As amostras foram analisadas em sextuplicata. As dosagens foram realizadas pelo método CBA – Cytometric Bead Array, utilizando-se o kit comercial Inflammation® (BD Biosciences, USA), que inclui sistemas de detecção de citocinas por meio de *beads* de captura (método sanduíche) para IL-12p70, INF- γ , MCP-1, TNF- α , IL-6 e IL-10. Do total de amostras, aquelas abaixo do limite de detecção foram registradas como “zero”. Os resultados foram obtidos em pg/ml.

3.5.2 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Parte do sobrenadante foi submetida à dosagem de nitrito (NO_2^-), um metabólito do NO produzido pelos macrófagos em cultura. As 6 amostras de cada

grupo foram usadas em duplicatas mediante método colorimétrico em 2 placas de 96 poços, sendo misturados em cada poço 100 µl do sobrenadante e 100 µl do reagente de Griess (NEED 0,1% e sulfanilamida 1%). As placas foram deixadas por 10 minutos em temperatura ambiente e lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em µM de NO para 5×10^5 células.

Uma curva-padrão foi construída a partir da solução de origem com 100 µM 140mg de nitrito de sódio (SIGMA-MERCK, USA) + 10 ml de água destilada, cujos pontos foram obtidos a partir de concentrações decrescentes da diluição que variaram de 100 a 0 µM. e representados em gráfico de dispersão, de onde se obteve a equação da reta. Os dados das amostras foram expressos como densidade ótica (DO) e comparados com a curva padrão de nitritos para cálculo das concentrações.

3.6 Análises de atividade celular

3.6.1 Dosagem de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Após 24 horas de incubação em garrafa, os macrófagos foram ressuspensos em meio RPMI-1640 e transferidos para placa de cultura de 24 poços, com seus respectivos tratamentos, na concentração de 5×10^5 células por poço e desafiados, em sextuplicata.

Em paralelo, foi preparada uma solução tampão a partir da composição de outras 3 soluções: solução A (800 ml de água destilada; 80 g NaCl; 2,0 g de KCl; 2,0 g de KH₂PO₄ e 11,5 g de Na₂HPO₄); solução B (100 ml de água destilada e 1,0 g de CaCl₂) e solução C (30 ml de água destilada com 0,64 g de MgCl₂). O tampão completo foi composto de 0,8 ml da solução A; 0,1 ml da solução B e 0,1ml da solução C, mais o acréscimo de 0,1 ml de vermelho fenol (Inlab, Brasil) e de 0,1ml de peroxidase (SIGMA-MERCK, USA) com 1,0 ml de Glicose (Dinâmica, Brasil) e 7,8 ml de água destilada. Após a incubação por 24 horas, os sobrenadantes eram coletados e congelados e cada poço recebia 300 µL da solução tampão.

Para o bloqueio da reação, foram acrescentados 10 µL de solução 4% de NaOH 1M, solução de glicose 1%, solução 0,03% de peróxido de hidrogênio comercial 30 volumes (Dinâmica, Brasil), peroxidase (SIGMA-MERCK, USA) tamponada com solução de fosfato de potássio e PMA - *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (SIGMA-

MERCK, USA) diluído em DMSO – dimetil sulfóxido (SIGMA-MERCK, USA) em cada poço.

Para a curva-padrão, foi utilizada solução de peróxido de hidrogênio em concentrações crescentes de 0,5 a 8,0nM. 100 µL dos sobrenadantes de cada poço foram colhidos para leitura imediata em placa de 96 poços. A leitura colorimétrica foi realizada em comprimento de onda de 620 nm. A cultura em placas de 24 poços permitiu a produção de uma quantidade maior de peróxido de hidrogênio por permitir o cultivo de número maior de células por poço em relação à placa de 96 poços, elevando a sensibilidade do método.

3.6.2 Expressão de receptores TLR4

Para o melhor entendimento do efeito paradoxal proposto por Eizayaga *et al.* (2019) procedeu-se com a pesquisa da regulação da expressão de receptores TLR4 na superfície macrofágica pela Aspirina ultradiluída 15 cH e respectivos controles. Após a padronização mediante quantificação no aparelho Countess e correção matemática na distribuição de $2,0 \times 10^5$ células por garrafa média, sendo um total de 10 garrafas (uma por tratamento), as mesmas foram mantidas em condições controladas na estufa e desafiadas no dia seguinte. Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados e as células foram novamente quantificadas em aparelho Countess®, sendo necessárias $1,5 \times 10^6$ células por garrafa para um experimento completo. Os grupos estão expressos abaixo.

Foram realizadas 3 replicatas experimentais, sendo cada uma com três repetições. Cada rodada contou com 10 garrafas que foram desafiadas conforme os respectivos tratamentos. Foram coletados de cada garrafa, 300 µl da solução de RPMI enriquecida de 10 % de SFB com $1,5 \times 10^6$ células/ ml que, por sua vez, foram redistribuídos em 10 tubos Falcon identificados e mantidos em gelo. Cada tubo recebeu 1% do volume final de Fc block e os mesmos foram incubados por 20 minutos em gelo. Posteriormente, cada tubo recebeu um volume de 200 µl de solução de PBS-BSA (1%), sendo o volume final de cada tubo equivalente a 503 µl. Esse volume foi então dividido em 3 microtubos com 167 µl cada, destinados à triplicata da amostra.

Assim, cada uma das 3 rodadas foi composta por um microtubo oriundo de cada uma das garrafas. Todos foram acondicionados em gelo.

As alíquotas de anticorpo TLR4 estavam estocadas a uma concentração de 200 µg/ml. Para o alcance de uma concentração de 1 µg/ml, concentração considerada ótima segundo os pilotos realizados, diluiu-se 0,8 µl da solução de estoque em 149,2 µl de BSA (*Bovine Serum Albumin*). Os microtubos foram centrifugados por 7 minutos a 0,3 rcf (força centrífuga relativa), os sobrenadantes descartados e as células ressuspendidas em 30 µl da diluição de 1 µg/ml e incubados por 20 minutos em gelo. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados, lavados com solução PBS, e no final, 200 µl de PBS foram adicionados ao *pellet*, agitando-o, antes da leitura em citometria de fluxo.

3.6.3 Atividade oxidativa

Para essa análise, foi utilizada uma sonda fluorimétrica 6-carboxi-2',7'diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCF-DA), capaz de detectar a presença de ERO intra-celular. A solução estoque foi alíquotada em 100 mM, sendo a concentração desejada da solução de trabalho igual a 1 µM (1 µl da sonda a 100 mM + 999 µl de PBS). As células foram preparadas da mesma forma descrita no item anterior. Foram realizadas 2 replicatas biológicas, cada uma com 3 repetições. Porém, em nenhum momento foram acondicionadas em gelo, mas protegidas da luz, uma vez que a sonda fotossensível, se exposta à luz, poderia prejudicar a detecção de ERO. A partir de um volume de 300 µl correspondente às amostras dos grupos, todas com o mesmo número de células por ml ($1,5 \times 10^6$), fez-se a divisão do volume para 3 microtubos (que receberam um volume de 100 µl), contendo 5×10^5 células cada. Os microtubos foram centrifugados em microcentrifuga Hettich (Tuttlingen, Alemanha) por 7 minutos a 0,3 rcf e as células foram ressuspendidas em solução de 1 µM da sonda (5 µl sonda a 100 µM + 495 µl de PBS) e incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas, lavadas em PBS por 2 vezes, sendo por fim adicionado um volume de 200 µl de PBS para serem ressuspendidas e levadas ao citômetro para a leitura.

3.6.4 Viabilidade celular

Para a avaliação dos efeitos da citotoxicidade do LPS, água sucusssionada, Aspirina 15 cH e associações nos macrófagos, foram realizadas análises mediante o teste MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide). Esse teste avalia a habilidade da enzima mitocondrial Succinato desidrogenase em reduzir o sal tetrazólio em formazan, um extrato líquido oriundo da transformação celular. Em placas de cultura de 96 poços, cada grupo foi composto por 4 poços em que 2×10^5 células foram acondicionadas em cada um com seus devidos tratamentos. Após 24 horas de incubação em condições controladas (37°C com $5\% \text{CO}_2$), os sobrenadantes foram retirados com auxílio de pipeta, as células lavadas em PBS e adicionados $100 \mu\text{l}$ da solução de tetrazólio (reagente MTT) a uma concentração de $0,5 \text{mg/ml}$ em cada poço. A placa foi incubada por mais 4 horas em estufa e os poços receberam a adição de $100 \mu\text{L}$ de solução de DMSO para a solubilização dos cristais. A placa sofreu leve agitação por 15 minutos antes da leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda a 570nm (Caillot et al., 2018). O experimento foi realizado em três repetições.

3. 7 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. A análise estatística e os gráficos foram realizados pelo programa GraphPad Prism 8.0 e a normalidade dos valores das amostras foi avaliada automaticamente pelo teste de Bartlett. A significância entre os valores foi analisada por ANOVA de um fator, e os resultados expressos em valor de F seguido do universo de determinações independentes expressos em graus de liberdade (entre os grupos; dentro dos grupos). O teste de Tukey foi utilizado como pós-teste nos casos de significância que, em todos os casos, foi fixado em $\alpha = 0.05$.

4 RESULTADOS

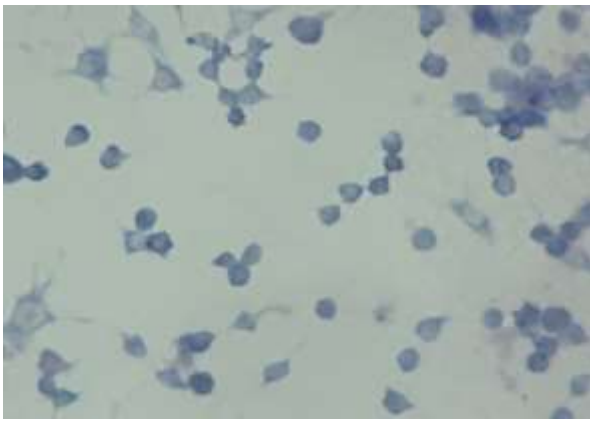
4.1 Espreadimento dos macrófagos

O ensaio experimental revelou semelhança de efeito nas ações isoladas de LPS e da Aspirina 15 cH no espreadimento das células. O estímulo por LPS em macrófagos RAW 264.7 é conhecido como potente polarizador do perfil M1, estimulando a célula ao *burst* oxidativo e ao processo de fagocitose. Paradoxalmente, a associação de LPS e Aspirina 15 cH diminuiu o espreadimento para níveis comparáveis às células não desafiadas (*unchallenged*), mimetizando o perfil desse tratamento descrito anteriormente em modelo de trombogênese (DOUTREMEPUICH *et al.*, 2007; EIZAYAGA, 2006; 2007; DOUTREMEPUICH *et al.*, 2010). A simples adição de água sucussionada não produziu mudanças significativas, sendo seu efeito comparável às células não desafiadas (Figura 2).

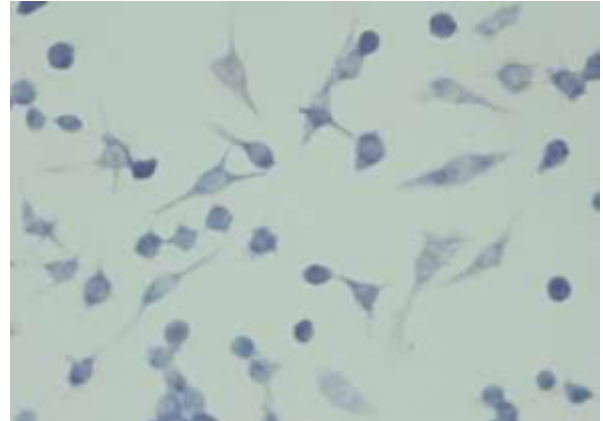
Uma inibição ainda mais acentuada do *spreading* após estimulação das células com LPS é observada após a associação com Aspirina 15 cH – EF (submetida à corrente elétrica fraca) ou simplesmente água sucussionada, efeitos comparáveis ao controle positivo (anti-inflamatório): Aspirina200 µg/ml (Figura 2).

O controle sistemático do método, feito pela comparação entre LPS, água sucussionada e associações, mostra um possível efeito de diluição, considerando que efeito similar foi produzido pela simples adição de água no poço (Figura 3).

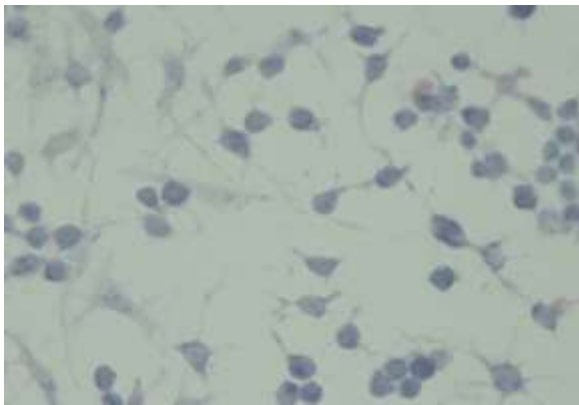
Tomados os dados em conjunto, tem-se que o principal efeito observado para o *spreading* é o aumento da área celular após a administração de LPS ou Aspirina 15 cH associado ao efeito paradoxal do tratamento simultâneo das células com ambos, com reversão dos efeitos individuais (Figura 4).



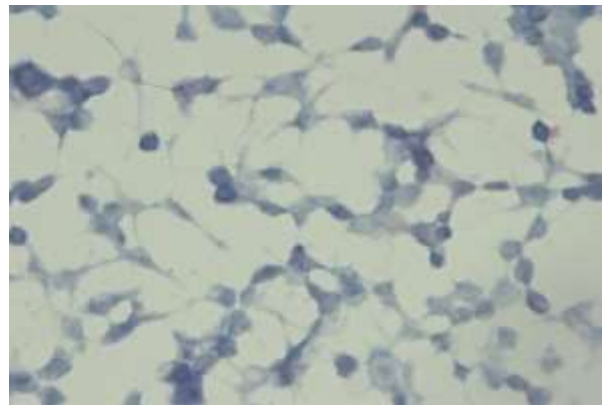
Macrófagos Grupo não-desafiado



Macrófagos Grupo água sucussionada



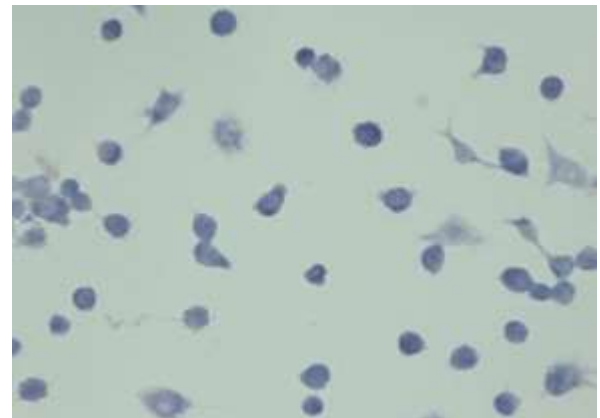
Macrófagos Grupo LPS



Macrófagos Grupo Aspirina 15 cH



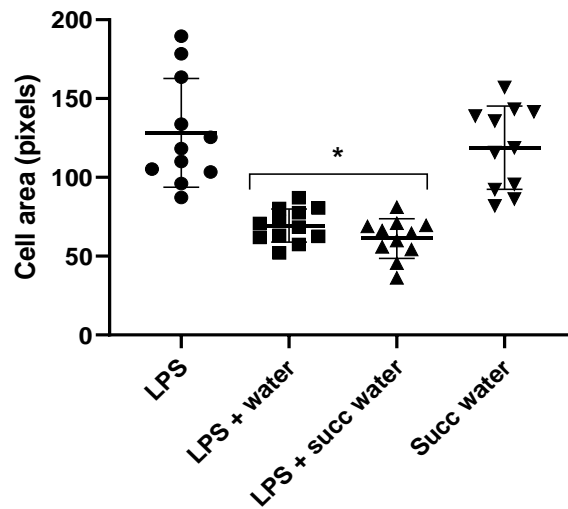
Macrófagos Grupo Aspirina 200 µg/ml



Macrófagos Grupo LPS + água

Figura 2 - Fotomicrografias de macrófagos aderidos a lamínulas e cultivados em meio R10, desafiados com LPS 1µg/ml e expostos por 24 horas a diferentes tratamentos. Aumento de 200 X.

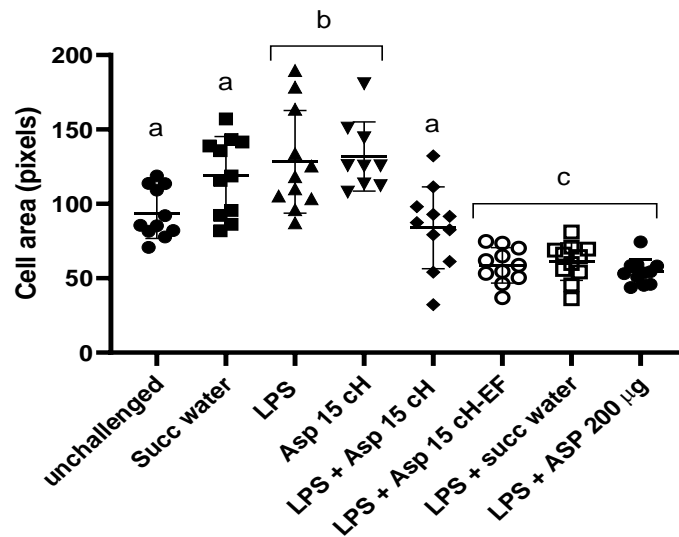
SPREADING - systematic control



$F(3,41) = 24.52, p < 0.0001$; Tukey, $*p < 0.0001$ in rel. others

Figura 3 – Controle sistemático: Área celular média, em pixels, para demonstração do espriamento dos macrófagos RAW 264.7 após diferentes estímulos e tratamentos. $F_{(3,41)}=24.52, p < 0,0001$; *pós teste de Tukey, $p < 0,0001$. Succ water = água sucussionada; Water = água. 2 replicatas, 2 repetições.

SPREADING - experimental assay



$F(7,78) = 22.57, p = 0.0001$; Tukey, $p \leq 0.05$ among categories

Figura 4 – Área celular média, em pixels, para demonstração do espriamento dos macrófagos RAW 264.7 após diferentes estímulos e tratamentos. $F_{(7,78)}=22.57, p = 0,0001$; *pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$ entre categorias. *Unchallenged* = não desafiado; Succ water = água sucussionada; Asp 15 cH = Aspirina 15 cH; Asp 15 cH-EF = Aspirina 15 cH submetida à corrente elétrica fraca; ASP 200 µg = Aspirina 200 µg/ml. 2 replicatas, 2 repetições.

4.2 Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Células não desafiadas mostram produção de peróxidos em torno de 5nM/ 5x10⁵ células e a incubação concomitante com LPS ou Aspirina 15 cH baixou esse nível para 2nM/ 5x10⁵ (Santana et al., 2017). A redução dos níveis de peróxido de hidrogênio, após o estímulo com LPS, foi potencializado pela adição de água sucussionada, Aspirina 15 cH e Aspirina 200 µg/ml (controle positivo), sendo que os níveis de H₂O₂, nesses casos, tenderam a zero. Mais uma vez, o LPS e a Aspirina 15 cH apresentaram efeitos similares, que foram anulados pela associação de ambos (Figuras 5 e 6).

O controle sistemático, nesse caso, mostrou efeito anti-oxidante da água sucussionada, independente da administração de LPS. O mesmo efeito não foi reproduzido pela adição de água não sucussionada (Figura 5).

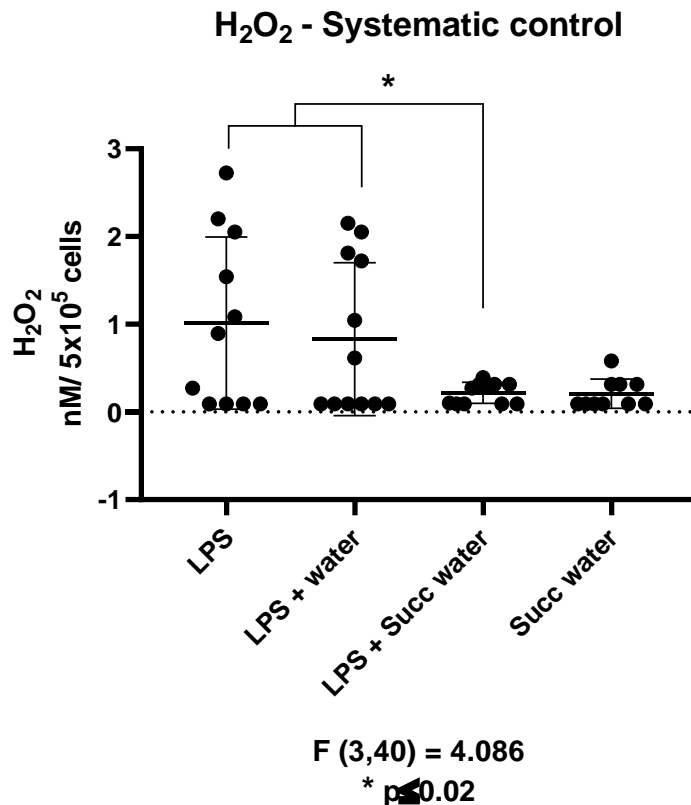


Figura 5 –Controle sistemático: Concentrações de H₂O₂ (nM / 5x10⁵ células) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada. F_(3,40)= 4.806, p=0,0127. Pós-teste de Tukey, *p≤0,05. Succ water = água sucussionada; Water = água. 2 replicatas, 2 repetições.

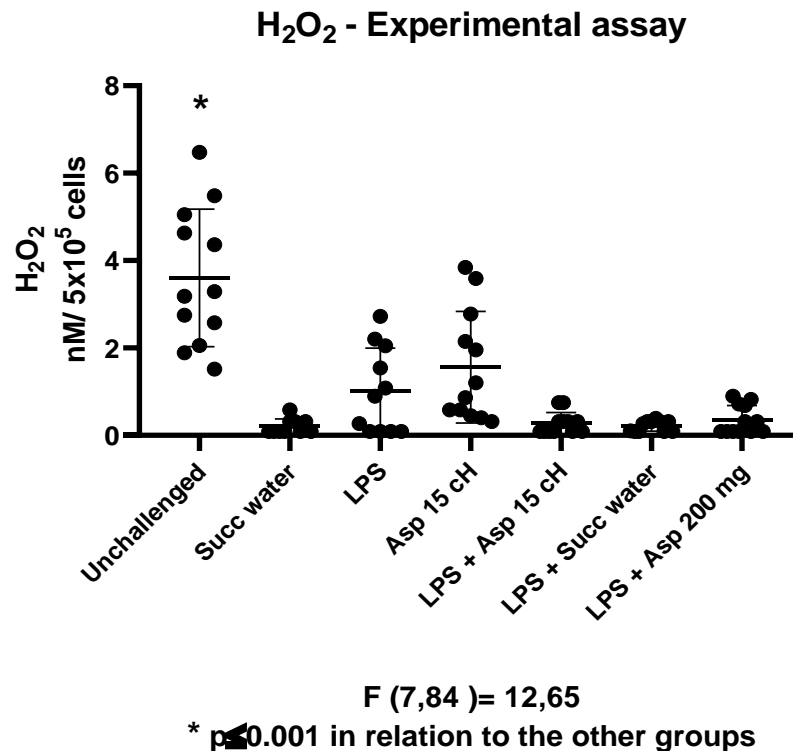


Figura 6 – Concentrações de H₂O₂ (nM / 5x10⁵ células) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos. F_(7,84)=12,65, p<0,0001. Pós-teste de Tukey, *p<0,002 entre categorias; #p<0,005 em relação a Aspirina 15 cH. *Unchallenged* = não desafiado; *Succ water* = água sucussionada; *Asp 15 cH* = Aspirina 15 cH; *Asp 15 cH-EF* = Aspirina 15 cH submetida à corrente elétrica fraca; *ASP 200 µg* = Aspirina 200 µg/ml. 2 replicatas, 2 repetições.

4.3 Produção de óxido nítrico (NO)

Neste ensaio, apenas os efeitos do LPS foram observados. Os sobrenadantes de células desafiadas com LPS apresentaram níveis de nitrito na ordem de 60 a 80 µM / 5 x 10⁵ células. Em contrapartida, os níveis de nitrito na população de células não desafiadas foram de 20 µM / 5 x 10⁵ células em média. A adição de água ou água sucussionada não alterou esse patamar. Pequenas oscilações na produção de nitrito foram notadas após a adição de água sucussionada e Aspirina 200 µg/ml em relação às células que receberam Aspirina 15 cH-EF, mas em todos os casos, a concentração de nitrito permaneceu entre 60 e 80 µM / 5 x 10⁵ células, conforme observado após o desafio com LPS (Figuras 7 e 8).

O controle sistemático mostrou que a água e água sucussionada reduzem parcialmente os níveis de nitrito, de 80 para 50 µM / 5 x 10⁵ células, provavelmente pelo efeito de diluição. Os níveis de nitrito em culturas tratadas somente com água sucussionada tendem a zero (Figura 7).

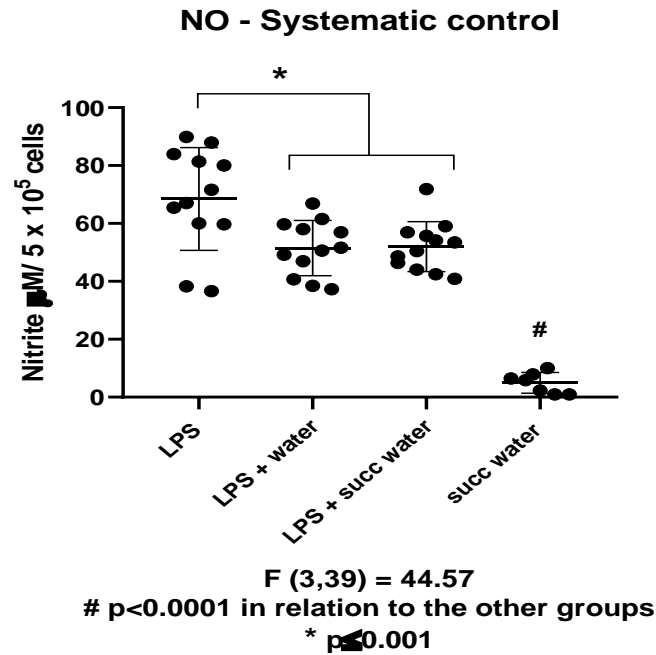


Figura 7 – Controle sistemático: Concentrações de nitrito ($\mu\text{M} / 5 \times 10^5$ células) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada. $F_{(3,39)} = 44.57$, $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey, * $p < 0,001$. Succ water = água sucussionada; Water = água. 2 replicatas, 2 repetições.

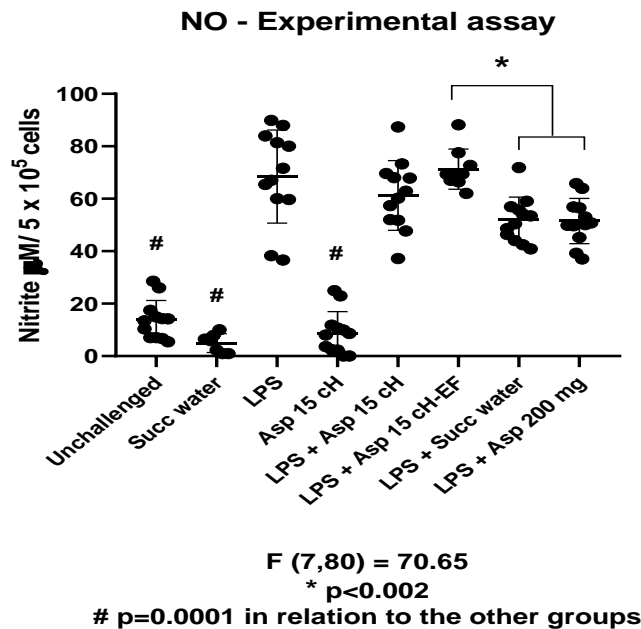


Figura 8 – Concentrações de nitrito ($\mu\text{M} / 5 \times 10^5$ células) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos. $F_{(7,80)} = 70.65$, $p < 0,002$. Pós-teste de Tukey, # $p = 0,0001$ entre grupos. Unchallenged = não desafiado; Succ water = água sucussionada; Asp 15 cH = Aspirina 15 cH; Asp 15 cH-EF = Aspirina 15 cH submetida à corrente elétrica fraca; ASP 200 μg = Aspirina 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 2 replicatas, 2 repetições.

4.4 Quimiocinas e Citocinas

4.4.1 MCP-1

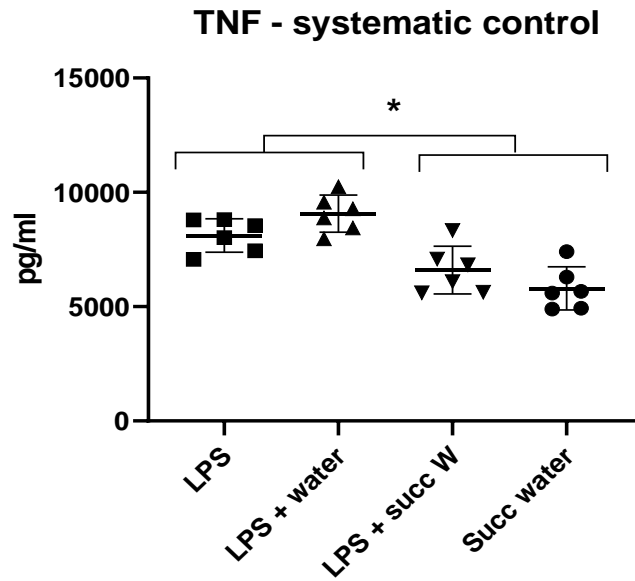
A proteína murina quimioatrativa de monócitos (MCP-1) não apresentou diferença significativa na comparação entre as amostras no teste de Friedman ($F_{7,40}=2.108$; $p = 0,0649$). Por sua vez, não foram detectadas concentrações mensuráveis de IL-12 e tampouco de INF- γ nas amostras. As médias das concentrações das seis análises de cada parâmetro por poço foram calculadas e expressas em conjunto com seus desvios padrões (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de concentrações de citocinas e quimiocinas por grupo (média \pm desvio padrão) expressos em pg/ml.

Tratamento	TNF-α ($p<0,05$)	IL-6 ($p<0,05$)	IL-10 ($p<0,05$)	Mouse MCP-1 ($p=0,16$)
<i>Unchallenged</i>	6.620,4 \pm 2.106,1	487,9 \pm 85,2	250,8 \pm 77,1	21.060,9 \pm 3.142,8
LPS	8.112 \pm 729,9	4.093,2 \pm 500,5	193,3 \pm 34,3	18.296,3 \pm 1.873,1
Asp 15 cH	6.371,1 \pm 1.044,2	593,1 \pm 59,8	82,8 \pm 15,9	21.500,6 \pm 860,2
LPS + Asp 15 cH	7.942,6 \pm 1.467,7	4.510,9 \pm 447,7	194,9 \pm 45,2	17.975,5 \pm 1.404,8
LPS + Succ Water	6.595,3 \pm 1.045,2	4.563,9 \pm 294,1	135,6 \pm 42,1	19.343,8 \pm 3.052,1
LPS + Asp 200 μ g	12.070,8 \pm 1.770,6	4.099,1 \pm 472,9	489,9 \pm 214,5	18.343,5 \pm 3.272,6
LPS + water	9.063 \pm 813	5.162,7 \pm 321	201,7 \pm 49	19.260,6 \pm 2.215,7
Succ water	5.796,1 \pm 943,9	538,1 \pm 58,95	50,5 \pm 13,5	21.190,3 \pm 2.388,5

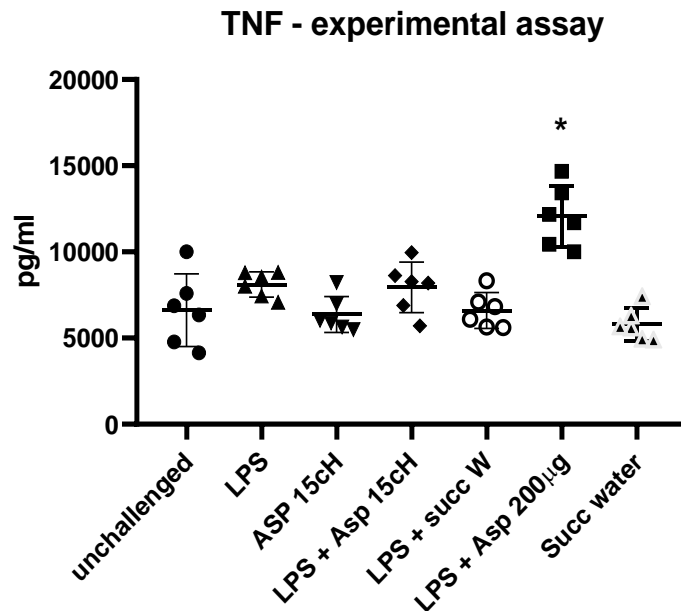
4.4.2 TNF- α

As concentrações de TNF- α não sofreram alterações após adição de LPS à cultura, comparando-se ao controle não desafiado, à exceção do tratamento adicional com Aspirina 200 μ g/ml, que apresentou aumento nos níveis de TNF- α em relação aos demais tratamentos (Figuras 9 e 10). O controle sistemático mostra redução dos níveis de TNF- α nos grupos tratados com água sucussionada, independentemente da associação ou não com LPS (Figura 9).



$F(3,20) = 16.35, p < 0.0001$; Tukey, * $p \leq 0.04$

Figura 9 – Controle sistemático: Concentrações de TNF α (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada. $F_{(3,20)}=16.35, p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey, * $p \leq 0,04$. Succ water = água sucussionada; Water = água. 2 replicatas, 2 repetições.



$F(6,35)=14.22, p < 0.0001$; Tukey, * $p \leq 0.0002$ in relation others

Figura 10 – Concentrações de TNF α (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos. $F_{(6,35)}=14.22, p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey, * $p \leq 0,0002$. Unchallenged = não desafiado; Succ water = água sucussionada; Asp 15 cH = Aspirina 15 cH; Asp 15 cH-EF = Aspirina 15 cH submetida à corrente elétrica fraca; ASP 200 µg = Aspirina 200 µg/ml. 2 replicatas, 2 repetições.

4.4.3 IL-6

A produção de IL-6 aumentou em todos os grupos desafiados com LPS, independente do tratamento (Figuras 11 e 12). O mesmo foi observado no controle sistemático (Figura 11).

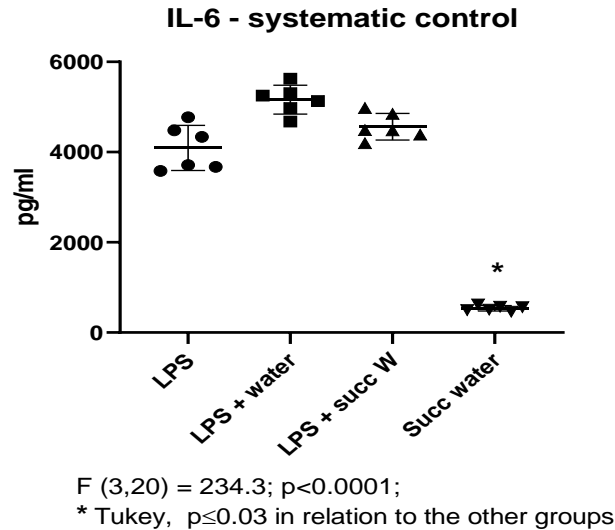


Figura 11 – Controle sistemático: Concentrações de IL-6 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada. $F_{(3,20)} = 234.3$, $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey, * $p \leq 0,03$. Succ water = água sucussionada; Water = água. 2 replicatas, 2 repetições.

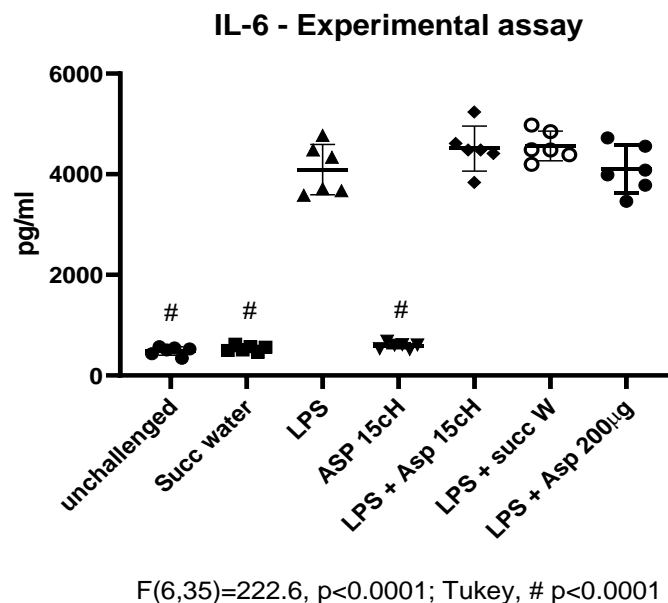


Figura 12 – Concentrações de IL-6 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos. $F_{(6,35)} = 222.6$, $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey, # $p < 0,0001$. Unchallenged = não desafiado; Succ water = água sucussionada; Asp 15 cH = Aspirina 15 cH; Asp 15 cH-EF = Aspirina 15 cH submetida à corrente elétrica fraca; ASP 200 µg = Aspirina 200 µg/ml. 2 replicatas, 2 repetições.

4.4.4 IL-10

O desafio com LPS não modificou a produção de IL-10, em comparação com as células não desafiadas, exceto quando associado à Aspirina 200 µg/ml, em que há aumento expressivo, denotando seu efeito anti-inflamatório, conforme observado por Belhassena et al., (2020). Em contrapartida, as células tratadas com água sucussionada ou Aspirina 15 cH mostraram redução de IL-10 no sobrenadante, independentemente de LPS, sugerindo ser um efeito pró-inflamatório da água sucussionada independente de COX-2 (Figuras 13 e 14). De fato, tal efeito não é observado na associação água – LPS (Figura 13).

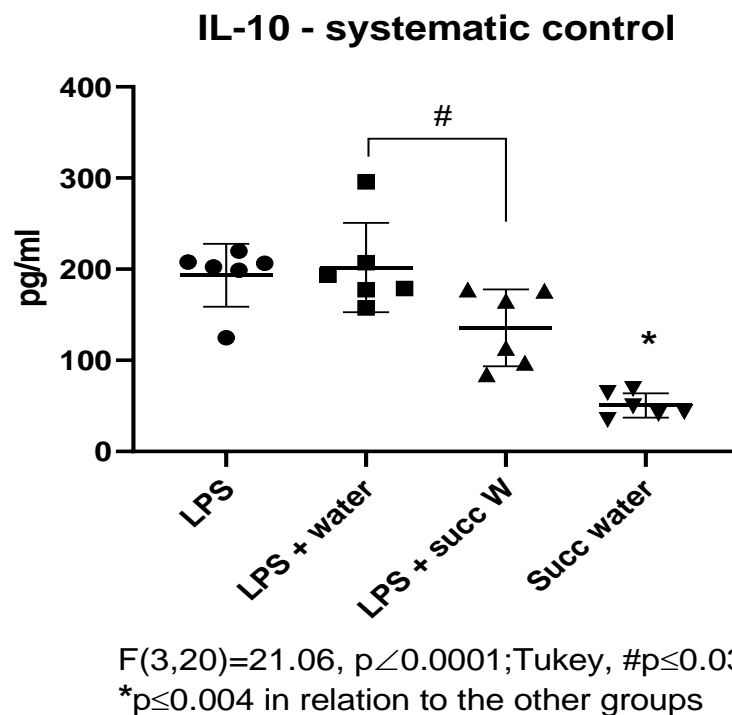
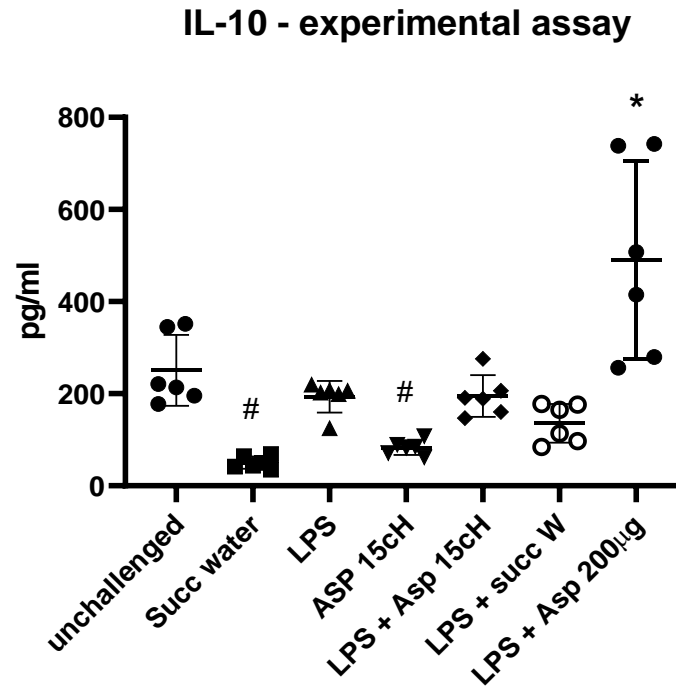


Figura 13 - Controle sistemático: Concentrações de IL-10 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS, água e água sucussionada. $F_{(3,20)} = 21.06$, $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey, # $p \leq 0,03$; * $p \leq 0,004$. Succ water = água sucussionada; Water = água. 2 replicatas, 2 repetições.



$F(6,35)=15.50$, $p < 0.0001$; Tukey $*p < 0.0001$ in relation to other groups;
 $\# p \leq 0.04$ in relation to unchallenged

Figura 14 - Concentrações de IL-10 (pg/ml) no sobrenadante de culturas de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos. $F(6,35)= 15.50$, $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey, $*p < 0,0001$; $\#p \leq 0,04$. Unchallenged = não desafiado; Succ water = água sucussionada; Asp 15 cH = Aspirina 15 cH; Asp 15 cH-EF = Aspirina 15 cH submetida à corrente elétrica fraca; ASP 200 µg = Aspirina 200 µg/ml. 2 replicatas, 2 repetições.

4.5 Expressão de receptores TLR4

A funcionalidade do modelo pode ser atestada no estudo do controle sistemático, mediante o significativo aumento no número absoluto de células positivas para TLR4 por amostra e na intensidade de fluorescência por célula (ou quantidade de TLR4 expressos na membrana), mediante o estímulo por LPS, independentemente do tratamento concomitante com água sucussionada (Figuras 15 e 17). A adição de Aspirina 15 cH-EF às células desafiadas com LPS potencializou o número de células positivas para TLR4, de forma estatisticamente significativa (Figura 16), mas não a expressão de TLR4 por célula (Figura 17). A Figura 19 traz exemplos de uma amostra por triplicata das análises, evidenciando os resultados pela sobreposição das porcentagens obtidas de eventos positivos (número absoluto) nos diferentes tratamentos. O controle negativo (cor cinza) representa macrófagos não-marcados

para TLR4 e foram obtidos a partir de grupo não-desafiado no experimento envolvendo a marcação intra-celular de ERRO pela sonda fluorimétrica.

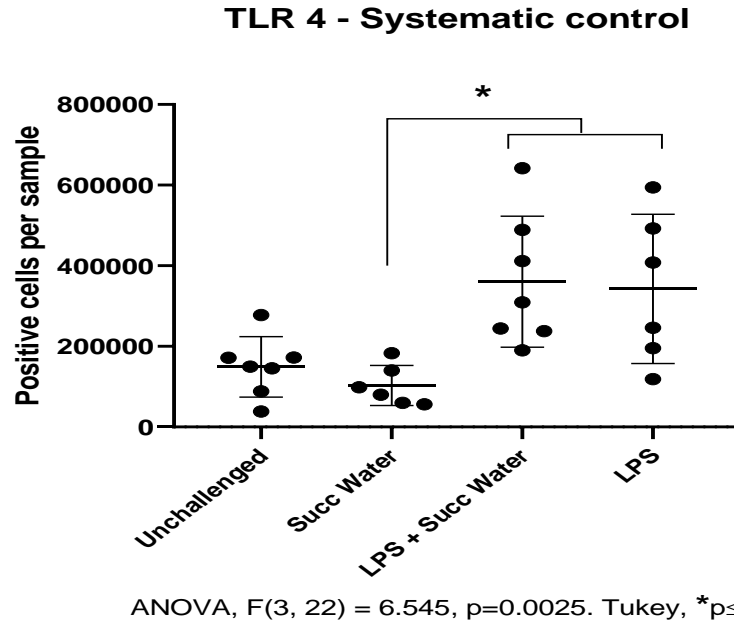


Figura 15 – Controle sistemático: Médias de eventos positivos percentuais referentes à marcação de receptores TLR4 em superfície de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo. $F_{(3,22)} = 6.45$, $p=.0025$. Pós-teste de Tukey, $*p \leq 0.03$. 3 replicatas, 3 repetições.

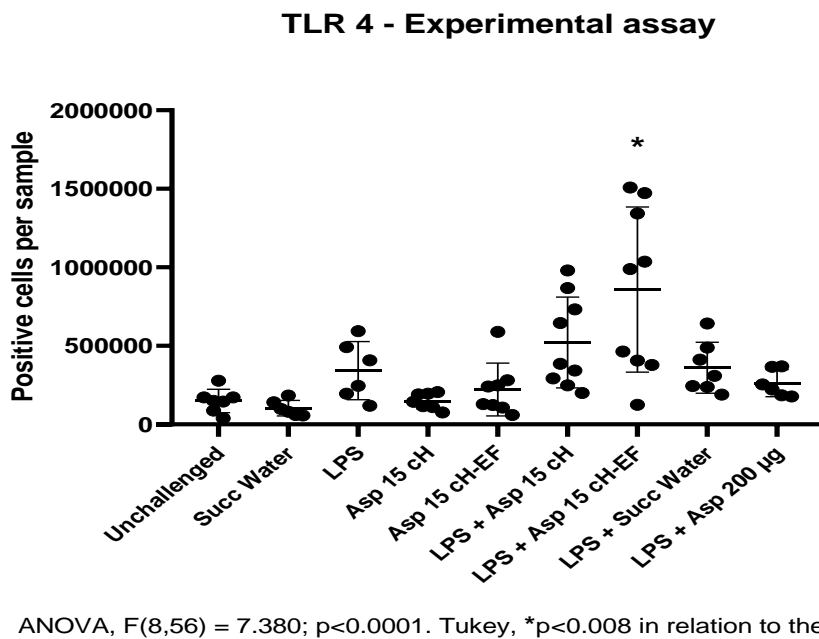
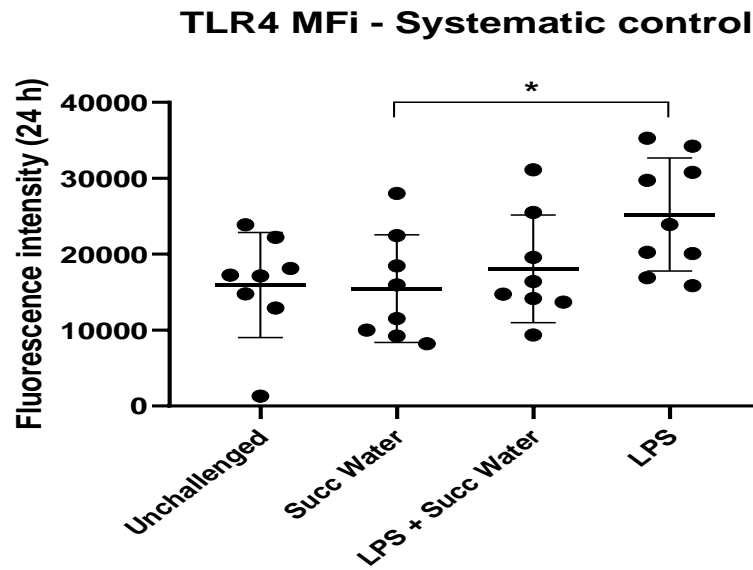
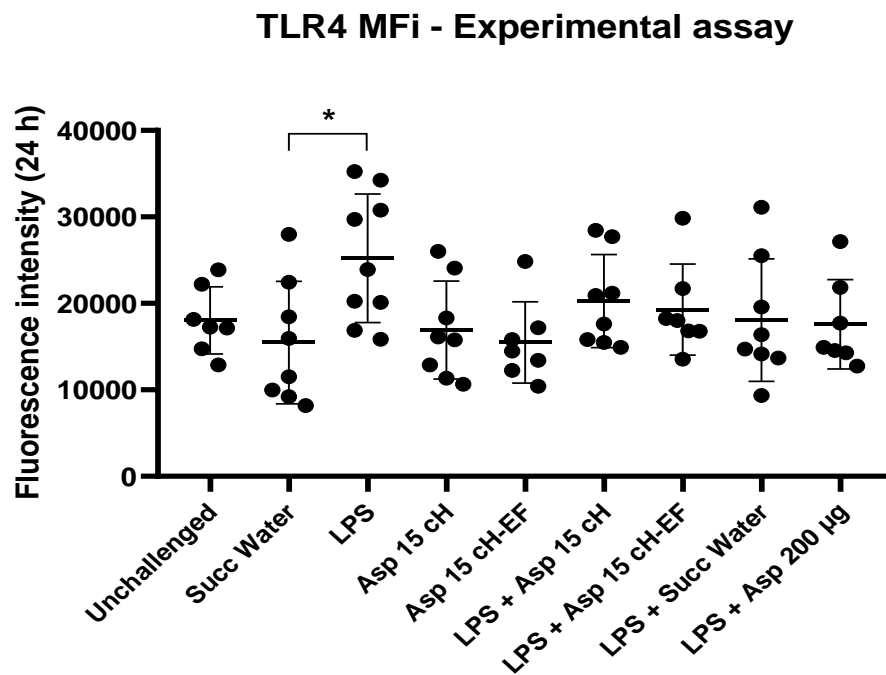


Figura 16 – Ensaio experimental: Médias de eventos positivos percentuais referentes à marcação de receptores TLR4 em superfície de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos. $F_{(8,56)} = 7.380$, $p < 0.0001$. Pós-teste de Tukey, $*p < 0.008$. 3 replicatas, 3 repetições.



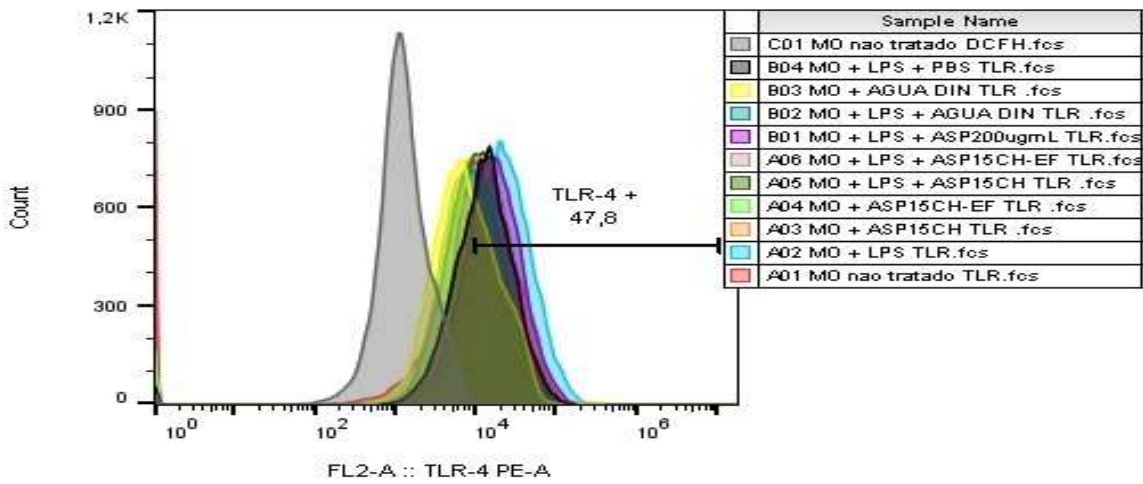
ANOVA, $F(3, 29) = 3.453$; $p=0.0292$. Tukey, $*p \leq 0.05$

Figura 17 – Controle sistemático: Médias da intensidade de fluorescência por macrófago RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo. $F_{(3,29)} = 3.453$, $p=0.0292$, Tukey, $*p \leq 0.05$. 3 replicatas, 3 repetições.

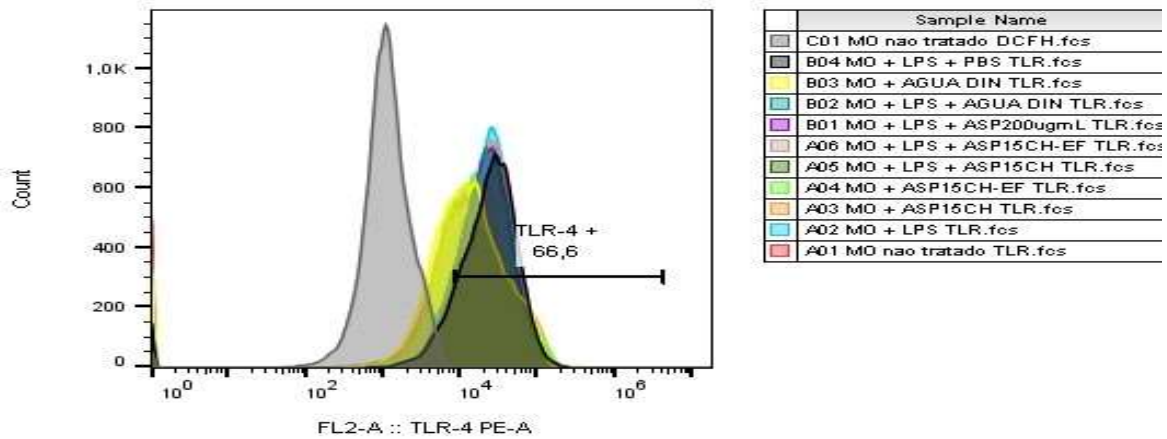


ANOVA, $F(8,60) = 2.214$, $p=0.0472$. Tukey, $*p=0.0329$

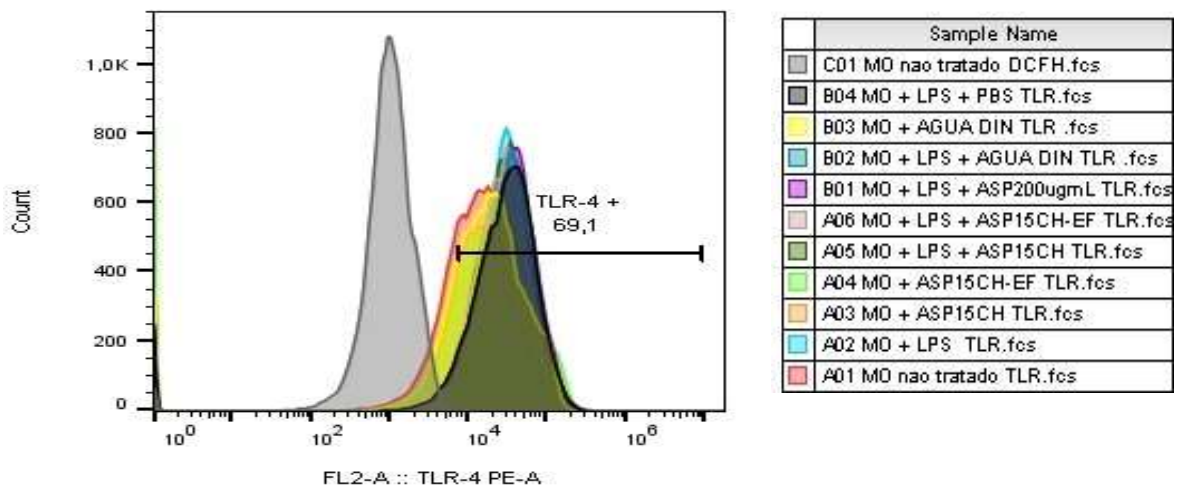
Figura 18 – Ensaio experimental: Médias da intensidade de fluorescência por macrófago RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo. $F_{(8,60)} = 2.214$, $p=0.0472$, Tukey, $*p=0.0329$. 3 replicatas, 3 repetições.



Triplicata 1



Triplicata 2

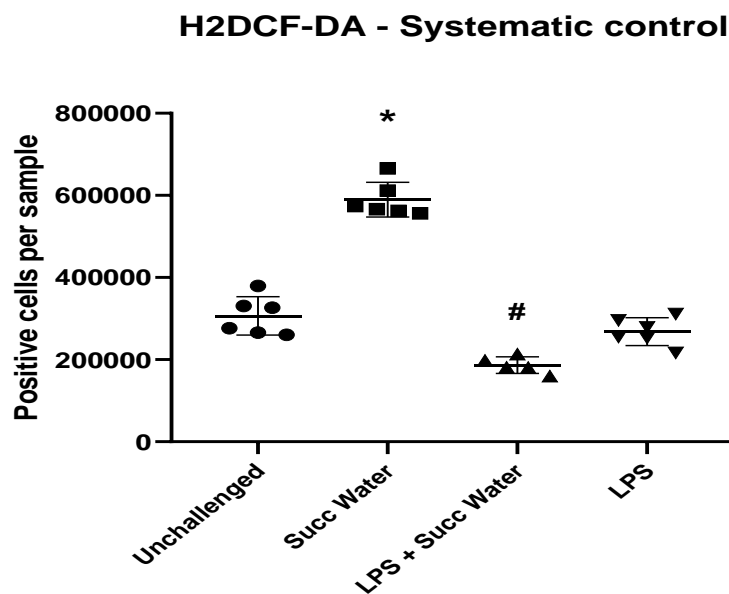


Triplicata 3

Figura 19 – Ilustrações das análises de números absolutos de eventos positivos por amostra referentes à marcação de receptores TLR4 em superfície de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos (imagens obtidas do software Flowjo).

4.6 Atividade oxidativa

Na avaliação da atividade oxidativa intracelular pela sonda colorimétrica 6-carboxi-2',7'diclorodihidrofluoresceína diacetato H₂DCF-DA, a clivagem de grupos acetatos por esterases intracelulares converte o não-fluorescente H₂DCFDA em uma molécula extremamente fluorescente, o 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), sendo a intensidade da fluorescência diretamente proporcional à concentração das espécies reativas de oxigênio intracelular. A citometria de fluxo permite a quantificação dessas marcações expressa em número absoluto de células positivas por amostra (Figuras 20 e 21) ou em intensidade de fluorescência por célula (Figuras 22 e 23). Quanto ao número absoluto de células positivas, o controle sistemático e o ensaio experimental revelaram, ambos, efeito paradoxal da água sucussionada em relação à presença ou ausência concomitante de LPS, considerando o número de células positivas (Figuras 20 e 21). O LPS em si mostrou padrão de resposta idêntico às amostras não desafiadas, indicando a não dependência ao LPS na expressão desse fenótipo. Contudo, não houve diferença entre os tratamentos em relação à intensidade de fluorescência por célula (Figuras 22 e 23).



ANOVA, $F(3,19) = 122.2$; $p < 0.0001$.
 Tukey, * $p = 0.0001$ and # $p \leq 0.05$ in relation to the other groups

Figura 20 – Controle sistemático: Número de células positivas no *gate* referentes à marcação de espécies reativas de oxigênio no espaço intracelular de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo. $F(3,19) = 122.2$, $p < 0,0001$. Pós-teste de Tukey, * $p = 0.0001$ e # $p \leq 0.05$ em relação aos demais grupos. 2 replicatas, 3 repetições.

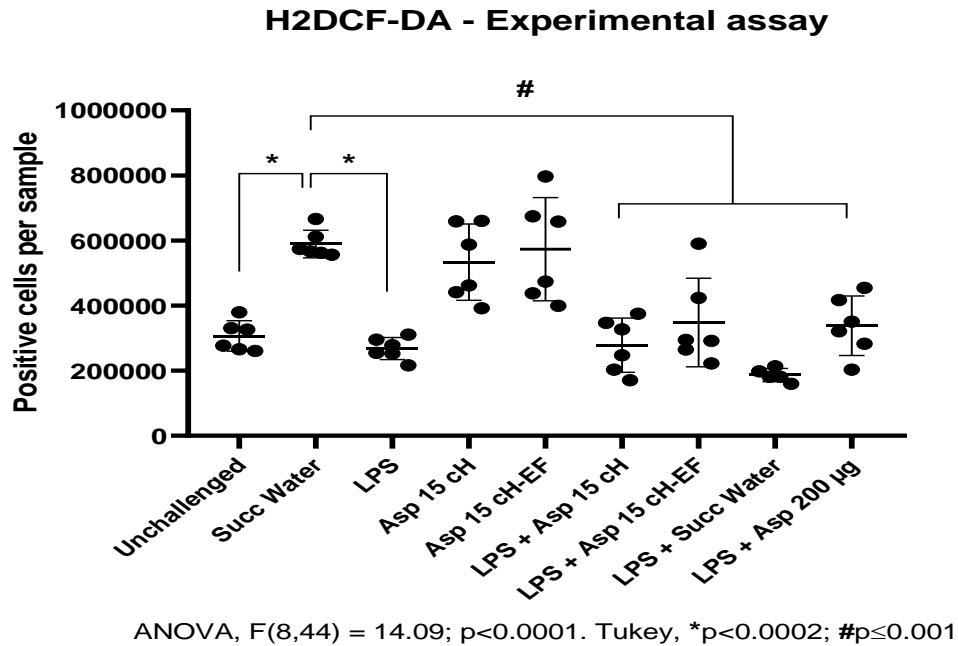


Figura 21 – Ensaio experimental: Número de células positivas no *gate* referentes à marcação de espécies reativas de oxigênio no espaço intracelular de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos. $F_{(8,44)} = 14.09$, $p < 0.0001$. Pós-teste de Tukey, * $p < 0.0002$; # $p < 0.001$. 2 replicatas, 3 repetições.

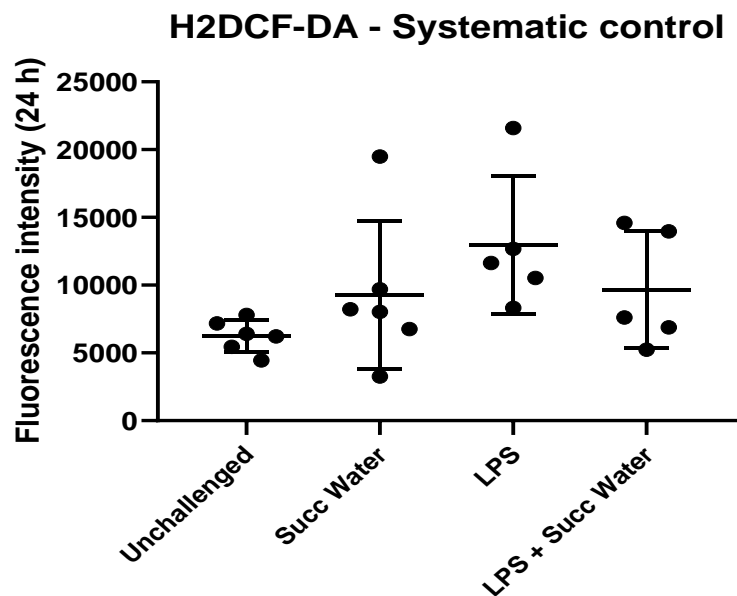


Figura 22 – Controle sistemático: Médias da intensidade de fluorescência por macrófago RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo. $F_{(3,18)} = 2.205$, $p = 0.1227$. 2 replicatas, 3 repetições.

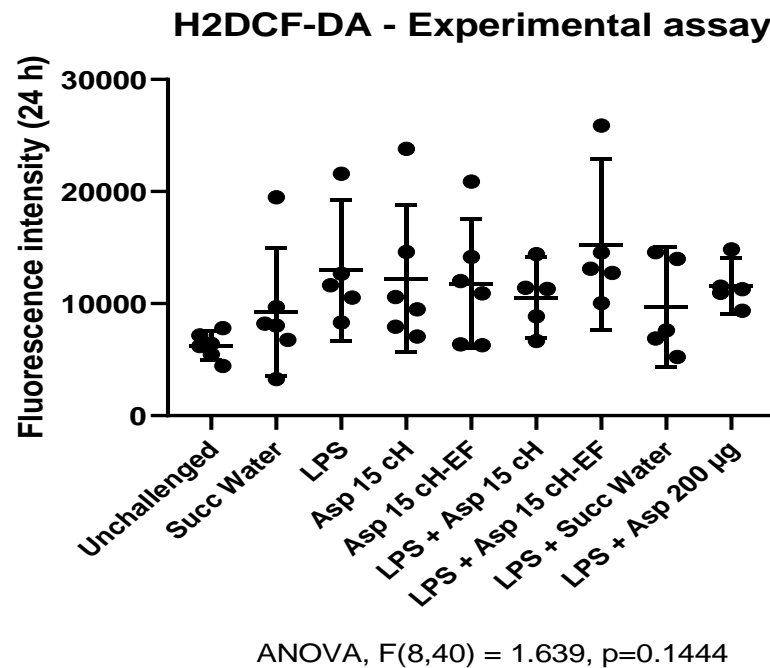


Figura 23 – Ensaio experimental: Médias da intensidade de fluorescência por macrófago RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada, avaliados em citometria de fluxo. $F_{(8,40)} = 1.639$, $p=0.1444$. 2 replicatas, 3 repetições.

4.7 Viabilidade celular

As análises de viabilidade celular foram realizadas por meio do reagente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). De forma esperada, o grupo *Unchallenged* apresentou os melhores níveis de viabilidade celular, expressos por meio de absorbância mediante leitura das placas de cultura em espectrofotômetro com 540 nM. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos, aferindo que nenhum dos tratamentos teve efeito citotóxico, nem tampouco efeitos sobre a atividade mitocondrial dos macrófagos RAW 264.7 (Figuras 24 e 25).

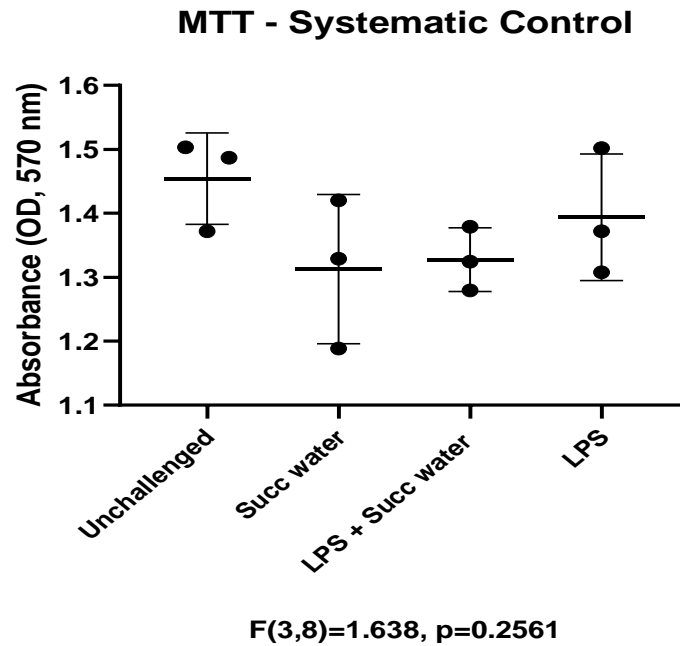


Figura 24 – Controle sistemático: absorbância referente à análise da viabilidade de macrófagos RAW 264.7 sob estímulo de LPS e água sucussionada – teste MTT. $F_{(3,8)} = 1.638, p=0.2561$. 1 replicatas, 4 repetições.

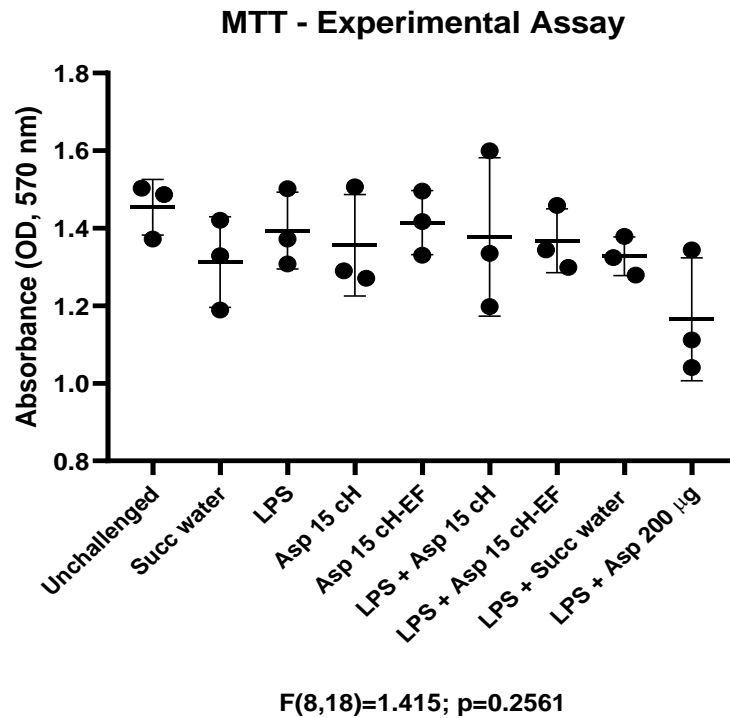


Figura 25 – Ensaio experimental: densidade ótica referente à análise da viabilidade de macrófagos RAW 264.7 sob diferentes estímulos – teste MTT. $F_{(8,18)} = 1.415, p=0.2561$. 1 replicatas, 4 repetições.

5 DISCUSSÃO

5.1 Os resultados observados e sua classificação

O presente estudo teve como objetivo observar os efeitos da Aspirina 15 cH (uma preparação homeopática) na atividade de macrófagos *in vitro* estimulados com LPS (agente ativador de COX-2), sendo a principal motivação a compreensão dos efeitos paradoxais da Aspirina 15 cH em modelo experimental de tromboinflamação (DOUTREMEPUICH *et al.*, 2007; EIZAYAGA *et al.*, 2006; 2007; DOUTREMEPUICH *et al.*, 2010), partindo-se do pressuposto de que haveria participação de macrófagos nesse processo.

Os ensaios foram planejados de forma que vários controles puderam oferecer informações sobre os mecanismos envolvidos em cada parâmetro estudado. Assim, o controle negativo (*baseline*) foi definido como células não desafiadas nem tratadas, sendo denominadas de *unchallenged*, para comparação com as células desafiadas com LPS (1 µg/ml). Outro importante controle, que teve por fim aferir se o fator diluição das culturas pela simples adição dos tratamentos poderia alterar alguns parâmetros, consistiu na adição de água estéril na cultura em adição ao LPS, obedecendo ao mesmo volume dos tratamentos empregados, sendo esse grupo denominado de *water*. Dado que a agitação da água durante o processo de fabricação de diluições homeopáticas (ou succussões) produz nanoestruturas no solvente, em especial nanobolhas (AGARWAL *et al.*, 2011; DEMANGEAT, 2015), optou-se pela adição de água succussionada estéril como controle suplementar (*succussed water*), em associação ou não ao LPS. A Aspirina 15 cH, por sua vez, também foi testada em associação ou não ao LPS e, por fim, o controle positivo foi a Aspirina 200 µg/ml, concentração ponderal de uso farmacológico, conhecida como inibidora da atividade de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (LIU *et al.*, 2017a).

Para facilitar a interpretação dos dados, os efeitos dos diferentes tratamentos foram pareados em uma análise paralela, chamada de “controle sistemático”, em que a água succussionada, o LPS, a associação de ambos e a associação do LPS à água (não submetida à succussão), foram comparados entre si, para tornar evidentes possíveis efeitos inespecíficos de tais preparações.

A comparação dos efeitos da Aspirina 15 cH com cada um dos controles, portanto, permitiu inferir mecanismos para cada parâmetro estudado, norteando o desenho experimental das etapas seguintes do projeto.

O ensaio do MTT não revelou alteração da viabilidade celular, permitindo descartar a possibilidade de que as variações dos outros parâmetros decorram de morte celular ou mesmo de mudanças na atividade mitocondrial em função dos tratamentos e da água sucussionada em que se infere seja rica em nanobolhas. Os resultados obtidos no ensaio realizado com a sonda colorimétrica H2DCF-DA corroboram essa conclusão.

A observação dos efeitos do LPS sobre os macrófagos RAW 264.7 permitiu aferir a validação do modelo experimental, pois produziu efeitos esperados, como aumento de NO (RÓSZER, 2015), IL-6 (CHAO *et al.*, 2015) e aumento no *spreading* (JAIN; VOGEL, 2018), caracterizando a polarização dos macrófagos para o padrão M1. A associação de LPS e água ou água sucussionada produziu discreta redução desse efeito, sugerindo efeito de diluição inespecífico nesse caso.

O controle positivo (Aspirina 200 µg/ml) mostrou efeito anti-inflamatório típico de inibidores da COX em associação ao LPS nas culturas, como aumento de IL-10 (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2000), redução do *spreading* e da produção de H₂O₂. A anulação dos efeitos do LPS sobre esses parâmetros pela Aspirina em concentrações anti-inflamatórias mostra a participação da COX. O aumento na produção de TNF-α observado na associação Aspirina 200 µg/ml, contudo, não está associado à atividade da COX, mas a uma via independente em macrófagos ativados por LPS (HO *et al.*, 2001).

O tratamento das células com Aspirina 15 cH mostrou aumento tanto do *spreading* quanto da liberação de H₂O₂ ao meio extracelular, e a associação Aspirina 15 cH e LPS mostrou efeito paradoxal, como se um anulasse ao outro, à semelhança dos efeitos descritos na literatura (DOUTREMEPUICH *et al.*, 2007; EIZAYAGA, 2006; 2007; DOUTREMEPUICH *et al.*, 2010).

Uma sùmula dos resultados pode ser vista no quadro abaixo:

Quadro 1 – Resumo dos resultados experimentais

Aspirina 15 cH	<ul style="list-style-type: none"> - aumento de H₂O₂ no sobrenadante (idem LPS) - aumento de <i>spreading</i> (idem LPS) - anulação dos efeitos em associação ao LPS (efeito paradoxal, como diminuição na expressão de receptores TLR4). Sem interferência na atividade oxidativa e na viabilidade celular
Aspirina 200 µg/ml	<ul style="list-style-type: none"> - aumento de IL-10 e TNF-α após desafio com LPS - redução de <i>spreading</i> e H₂O₂ após desafio com LPS - efeito anti-inflamatório clássico – inibição de COX sem interferência na atividade oxidativa e na viabilidade celular
Água sucussionada	<ul style="list-style-type: none"> - redução de H₂O₂ no sobrenadante - redução de IL-10, TNF-α e da expressão de TLR4 independente do desafio com LPS - aumento do <i>spreading</i>, - aumento na atividade oxidativa (número de células) com efeito paradoxal após estímulo concomitante com LPS
LPS	<ul style="list-style-type: none"> - aumento de NO, IL-6 e <i>spreading</i> - redução de H₂O₂ no sobrenadante - sem mudanças em IL-10 e TNF - estimulação da expressão de receptores TLR4 - não alteração da viabilidade celular nem a atividade oxidativa <i>per se</i>

5.2 Propostas de explicação para o paradoxo

5.2.1 Hipóteses biológicas

De acordo com Doutremepuich *et al.* (2010; 2013) e Eizayaga *et al.* (2019), a Aspirina 15 cH tem caráter trombogênico tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No presente estudo, o espraiamento dos macrófagos nas culturas expostas à Aspirina 15 cH e ao LPS (1µl/ml) apresentou alta significância estatística em relação às culturas não desafiadas ($p < 0,0001$), porém a associação de ambos os tratamentos reduziu o efeito de *spreading* para os mesmos níveis observados nas células controle (*unchallenged*),

como que se anulassem mutuamente, sugerindo a participação de COX-2 no processo, tendo visto que o LPS é capaz de ativar tal enzima (LAI *et al.*, 2017). Por outro lado, outros fatores envolvidos na ativação macrofágica pelo LPS também precisam ser considerados, como a expressão de TLR4 (KOTWAL; CHIEN, 2017). Um mecanismo de *downregulation* por efeito rebote, também poderia ser considerado nesse caso. Zhu *et al.* (2018) demonstram a participação de microRNA no processo de *downregulation* de TLR4 em macrófagos RAW 264.7 por mecanismo rebote.

Segundo esses autores mencionados anteriormente, se por um lado a Aspirina 15 cH poderia ter a capacidade de inibir COX-2 e PGE₂ e estimular trombina, impondo sua ação trombogênica, também seria possível concluir que a ativação dos fagócitos poderia se desenvolver por meio de mecanismo independente de COX-2 (DOUTREMEPUICH *et al.*, 2010; 2013 e EIZAYAGA *et al.*, 2019). Carestia *et al.* (2019) relataram que a inativação de ciclooxigenases plaquetárias pela Aspirina não impediu a manifestação do fenótipo M1 em culturas de macrófagos, corroborando essa hipótese. Na abordagem homeopática, tal efeito seria comparável ao chamado efeito primário da ultradiluição ou patogenesia.

A principal via de ativação de macrófagos M1 incitados por LPS envolve o estímulo de IL-1 β e a clivagem de AA na membrana celular pela enzima fosfolipase A2, com consequente liberação de COX-1. Essa, por sua vez, origina prostaglandinas como PGH₂ e PGE₂ e a subsequente ativação e migração do fator de transcrição NF- κ B (subunidades p50 e p65) ao núcleo celular, resultando na decodificação e síntese de citocinas e enzimas pró-inflamatórias como iNOS (óxido nítrico sintase) e COX-2 (LIU *et al.*, 2017a). A participação de COX-2, portanto, é induzida como uma consequência da ativação de vias de sinalização intracelulares bem definidas. Talvez o efeito modulador primário da Aspirina 15 cH esteja nos eventos iniciais da ação do LPS, inibindo toda a cadeia de sinalização.

Uma segunda via de ativação relacionada à polarização macrofágica por LPS e também iniciada por IL-1 β tem sido relatada (KO *et al.*, 2017): a via MAPK, com suas 3 proteínas mitógenas, sendo p38 e JNK (*c-junction N-terminal kinase*), relacionadas a processos celulares como apoptose, sobrevivência, transformação, desenvolvimento e migração, além de ativação imune, e ERK1/2 (*Extracellular signal regulated kinase*), ligada a eventos de proliferação, crescimento e diferenciação dos

macrófagos (ZHANG *et al.*, 2017). A via MAPK exerce um papel fundamental na produção de citocinas e espécies reativas mediante estímulo por LPS em macrófagos na inflamação (ISLAM *et al.*, 2018). A fosforilação dessas enzimas também culmina em liberação de citocinas como IL-6, decodificação nuclear de iNOS e consequente produção de NO, em um mecanismo independente de ciclooxygenases (CHEN *et al.*, 2008). Em experimento com macrófagos murinos, RAW 264.7, LIU *et al.* (2017a) observaram que a Aspirina ponderal (incluindo a dose de 200 µg/ml) inibe a expressão de iNOS pela inativação do fator NF-κB a partir de vias distintas: COX-2 e via proteínas IκK (*I kappa Kinase*) e IκB (*I beta Kinase*), reguladoras da migração do fator p65 ao núcleo celular. Dado que a Aspirina 15 cH não mostrou efeitos específicos sobre a produção de NO e nem de IL-6, é possível que essas vias não estejam envolvidas no seu mecanismo de ação.

Eizayaga *et al.* (2019) sugerem que o efeito rebote trombogênico que ocorre em torno do oitavo dia, após administração de uma dose única de 100 mg/kg de Aspirina em ratos, poderia se dar devido ao acúmulo de quantidades residuais da droga que permaneceram no endotélio ativado. Esse resíduo ainda poderia conter um metabólito com ação protrombótica ou que causasse a inibição de algum agente antitrombótico, resultando em um agregado plaquetário. Há uma complexidade na resposta plaquetária que não é linear e nem diretamente proporcional à dose de Aspirina empregada (RUKOYATKINA *et al.*, 2019).

Apesar da ação anti-inflamatória da Aspirina, com a inibição das ciclooxygenases e da geração de prostaglandinas, a inibição endotelial de PGI₂ e NO também reduziria a atividade dos nucleotídeos AMP-c e GMP-c correspondentemente, possibilitando ação trombótica plaquetária. Além disso, Procter *et al.* (2016) citam que a responsividade plaquetária a prostanoides e ao NO é anormal em indivíduos com doenças vasculares, em que o endotélio está constantemente inflamado.

Concentrações elevadas de TNF-α podem estimular o processo apoptótico em macrófagos pela via NF-κB, e são um interveniente fundamental do processo regulatório de fosforilação das proteínas quinases (LEE *et al.*, 2016). Outro importante produto relacionado à morte celular é o NO gerado a partir da expressão de iNOS dentro da mesma via NF-κB. Estímulos de LPS em receptores TLR4 de macrófagos

estão diretamente ligados a concentrações crescentes desses mediadores no meio de cultura (IDELMAN *et al.*, 2015). O tratamento das culturas com Aspirina 15 cH mostrou menores concentrações de NO e IL-6 no meio extracelular, apesar dos níveis de TNF- α terem sido muito similares entre os grupos LPS e Aspirina 15 cH. Em contrapartida, a porcentagem de células positivas para TLR4, bem como a intensidade de fluorescência (de TLR4) por célula não se alteraram com a exposição à Aspirina 15 cH, mas apenas ao LPS.

Porém, é fato que a diminuição na liberação de NO em macrófagos pode ser mediado pela proteína quinase JNK/c-jun (CHEN *et al.*, 2008) o que poderia explicar essa diferença em relação ao TNF- α que, por sua vez, é secretado precocemente na via NF- κ b (MUSSBACHER *et al.*, 2019). Portanto, é plausível presumir que a ação da Aspirina 15 cH não ocorra diretamente na via NF- κ B e sim nas proteínas quinases e de uma forma mais tardia.

Efeitos secundários à administração de dose anti-trombótica de Aspirina remetem a um conjunto de estímulos graduais *in vivo*, também denominado efeito “rebote” por alguns autores. O rápido metabolismo farmacocinético e o retorno funcional celular possibilitariam certa hipereatividade plaquetária com capacidade trombogênica ímpar, capaz de superar a regulação endotelial de PGI₂ e NO. Assim, esse processo parece estar relacionado a um conjunto de fatores que incluem TXA₂, NO, PGI₂, nucleotídeos cíclicos e células inflamatórias, como os macrófagos, e não apenas um metabólito específico. Após decréscimos em suas concentrações, esses fatores poderiam, vagarosamente, resultar em uma reação inflamatória que envolveria a trombina e culminaria em trombogênese, após 7 a 10 dias.

Nesse sentido, alguns elementos estão relacionados por mecanismos ainda desconhecidos no controle e inibição da via NF- κ B. Também de forma paradoxal, elevações do AMP-c intraplaquetário podem estar diretamente relacionadas a elevações dos níveis de IL-6 em macrófagos murinos ou RAW 264.7 (SAKAMOTO *et al.*, 2018), o que explicaria os efeitos da Aspirina 15 cH, além de sugerir uma ação independente da enzima fosfodiesterase tipo III, um inibidor específico de AMP-c.

NOX é uma enzima expressa independente dessas vias de indução, sendo responsável pela clivagem intracelular de NADPH e subsequente produção de O₂⁻ (BRANDES *et al.*, 2014). Em um mecanismo que visa amenizar a intensidade da

resposta inflamatória e a preservação celular, as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), no citosol, e Glutathione Peroxidase (GP), na mitocôndria, são ativadas e convertem o ânion O_2^- em H_2O_2 . Anfipática, essa molécula de peróxido transita livremente pelos compartimentos intra e extracelulares pelos canais de água (aquaporina) da membrana, sendo capaz de regular a manifestação de fatores envolvidos na inflamação.

Gunawardena *et al.* (2019) observaram que culturas de macrófagos RAW 264.7 sofriam uma inibição na produção de NO e TNF- α sob o estímulo de catalase, enzima que converte o H_2O_2 em H_2O (água) e O_2 (oxigênio), sugerindo um antagonismo dessa molécula de peróxido. A regulação da produção de peróxido associada à produção de TNF- α foi observada após o tratamento dos macrófagos com água sucussionada, independentemente da exposição concomitante com LPS. É possível que a atividade de NOX possa ser modificada frente à exposição das células às nanobolhas originadas da sucussão, dada sua ação anti-oxidante em diferentes sistemas celulares (HWANG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2018).

Em pesquisa com macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, LIU *et al.* (2017a) observaram regulação decrescente dessa citocina com diversas concentrações de Aspirina, incluindo 200 μ g/ml. Em pesquisa com monócitos humanos, Belhassena *et al.* (2020) demonstraram que, sob o estímulo de LPS, as células produziram concentrações proporcionalmente crescentes de TNF- α mediante as diversas soluções de Aspirina (10, 100 e 1000 μ M). Tais dados foram reproduzidos no presente estudo, uma vez que a concentração de TNF- α no sobrenadante aumentou após a inserção de Aspirina 200 μ g/ml. Por sua vez, Cambien *et al.* (2003) descreveram a atividade antitrombótica dessa citocina.

Sob estímulo de H_2O_2 , os macrófagos parecem preferir a via NF- κ B em favor da ativação de MAPK via JNK na superfície celular (GIACOPPO *et al.*, 2017). Além de ser um componente crucial na atração de macrófagos e na geração da resposta oxidativa (LIU *et al.*, 2017b), a presença de H_2O_2 extracelular também parece ter a capacidade de modular a resposta inflamatória mediante um contato direto célula-célula (GUNAWARDENA *et al.*, 2019).

O grupo controle não desafiado (*unchallenged*) obteve a maior produção de H_2O_2 (5 nM x 5 x 10⁵ células), indicando que talvez esse mediador já esteja formado

e armazenado no espaço intracelular. Koskenkorva-Frank *et al.* (2013) referem que grandes quantidades de H_2O_2 são produzidas em condições basais nos peroxissomas celulares e permanecem estáveis por meses. A adição de água, LPS ou Aspirina 15 cH levou à atenuação na produção de H_2O_2 , para níveis próximos de 1,5 a 2,0 nM x 5×10^5 células, por mecanismos não esclarecidos. Tais níveis de H_2O_2 também foram descritos em outros ensaios envolvendo macrófagos RAW 264.7 (SANTANA *et al.*, 2017). Não obstante, a presença concomitante de Aspirina 15 cH e LPS também produziu efeito paradoxal, com a inibição quase completa da produção de H_2O_2 . Dessa forma, considerando que tanto o *spreading* quanto a produção de H_2O_2 são etapas de uma mesma via de ativação, deflagrada pela síntese de fosfolipase A2 e NF- κ B, é plausível pensar que o efeito paradoxal entre LPS e Aspirina 15 cH esteja relacionado a esse mecanismo.

Uma especulação pode ser inferida a partir da observação de que o número de células positivas para a sonda H2DCF-DA foi significativamente maior após o tratamento com água sucussionada em relação às células não desafiadas (figura 21). Este aumento na atividade oxidativa poderia gerar maior produção de peróxidos em um processo de defesa celular. Porém, conforme observado na figura 6, estas moléculas de peróxido, tendem a ser inativadas pela água sucussionada, em um processo que resultaria em mais radicais OH^\cdot , tóxico para a célula, corroborando, portanto, a marcação intra-celular de EROs pela sonda fluorimétrica. Paradoxalmente, foi significativamente menor quando do co-tratamento com LPS. Esse fato sugere que o veículo sucussionado, *per se*, alimentaria a atividade oxidativa por maior oferta de oxigênio, carregado por nanobolhas, que estão sabidamente presentes em tais preparações (DEMANGEAT, 2015). Assim, talvez haja um duplo mecanismo envolvendo o efeito oxidativo do veículo sucussionado *per se*, e os efeitos específicos da Aspirina 15 cH sobre o *spreading* – H_2O_2 , sendo ambos perturbados pela presença do LPS.

A acoplagem de LPS nos receptores TLR4 desencadeia a clássica conversão de macrófagos inativados para o perfil M1, com o exercício de suas atividades microbicidas por meio de alterações em seu citoesqueleto que permitirão aumento do espraiamento e de fagocitose, além da produção e liberação de mediadores inflamatórios como quimiocinas, citocinas e ERO. Tais eventos estão sob a influência da modulação na expressão de microtúbulos, estruturas filamentosas que constituem

parte do citoesqueleto, altamente polarizadas e compostas pela associação dos heterodímeros α e β -tubulinas (BINKER et al., 2007), marcadores de estabilidade celular.

Bian et al. (2017) demonstraram que o estímulo de receptores TLR4 por LPS reduz a expressão de α e β -tubulinas, aumentando a plasticidade e permitindo alterações na morfologia celular como aumento do espreadimento, por meio da fosforilação e ativação da via p38 de MAPK. Dessa forma, conforme apresentado na Figura 4, é possível inferir que a ultradiluição 15 cH de aspirina possa ter inibido a produção e expressão das tubulinas tanto quanto o LPS, permitindo alterações no citoesqueleto que culminassem com maior espreadimento macrófágico em relação aos controles. A liberação de peróxidos no meio extracelular também seria favorecida, o que é evidenciado nesses dois grupos conforme visto na Figura 6 e proposto no modelo da Figura 26. efeito rebote. Corroborando essa informação, Seker et al. (2018) demonstraram alterações na estabilidade de microtúbulos promovida por ultradiluições de drogas antineoplásicas, como paclitaxel e docetaxel, resultando na inibição e replicação de células tumorais.

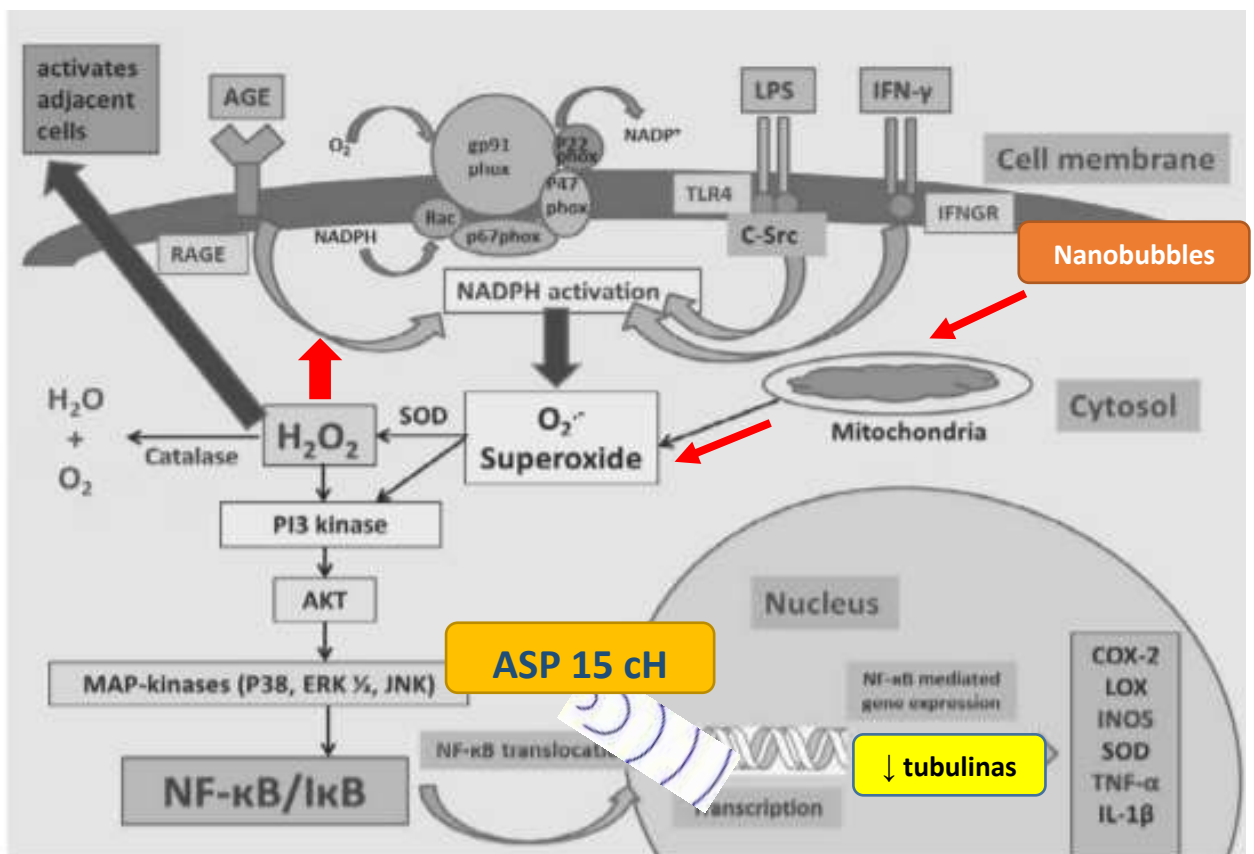


Figura 26 – Modelo proposto de ação intra-celular da ultradiluição 15 cH de aspirina. Adaptado de GUNAWARDENA et al. (2019)

A associação da aspirina 15 cH com LPS reduziu significativamente tanto o espriamento macrófágico como a liberação de peróxidos, em um processo que poderia estar relacionado com maior expressão de tubulinas independentemente de COX-2 e, conseqüentemente, com maior estabilidade celular.

Por outro lado, o NO é uma molécula versátil, produzido e atuante em diversas células e com papel também na regulação inflamatória (ISLAM *et al.*, 2018). Em condições fisiológicas, sua produção em escala nanomolar é efetivada por enzimas constitutivas como eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e nNOS (óxido nítrico sintase neuronal). Nos macrófagos ativados há aumento na produção de NO para níveis micromolares, por ação da iNOS (KOSKENKORVA-FRANK *et al.*, 2013). Apenas o LPS teve efeito sobre a produção de NO nesse modelo, de onde se conclui que essa não parece ser uma via importante na modulação macrófágica induzida pela Aspirina 15 cH.

O entendimento dos efeitos protrombóticos promovidos pelas ultradiluições de Aspirina também passa pela elucidação dos meandros que envolvem a transmissão de uma informação pelo medicamento homeopático. Em concentrações acima do número de Avogadro (10^{-24}), as ultradiluições de drogas podem apresentar possíveis ações moduladoras da expressão genética em sistemas biológicos, que podem ser estimulados ou suprimidos, conforme se elevam as diluições de uma substância (DEI, 2017), embora de forma não linear. Assim, este estudo permitiu a observação do típico padrão de hormese na resposta de sistemas biológicos às ultra-diluições. Efeito similar foi descrito por Calabrese e Giordano (2021), em que a amplificação sinalizatória foi constatada a uma concentração de 10^{-18} M, em que uma única molécula de AMP-c poderia estimular o aumento da atividade fagocítica de 3.300 macrófagos.

O conceito de inflamação gradual está diretamente relacionado às doenças crônicas, sendo o efeito secundário de drogas, a ativação de células do sistema imune e a ação de citocinas determinantes na suscetibilidade individual (ADLER, 2011). Na tentativa de reestabelecer o estado normal de equilíbrio, o sistema (organismo ou uma cultura celular) promoveria atividades regulatórias que estariam associadas à hormese, respostas celulares dependentes da diluição do medicamento e com

inversão de efeitos biológicos como a ativação ou inibição de funções mediante o emprego de baixas ou altas diluições, respectivamente (BELLAVITE, 2018). O estímulo da ultradiluição também permitiria potencializar capacidades adaptativas a esse sistema como em microambientes com altas concentrações de ERO, em que células como macrófagos otimizam seu processo respiratório de forma glicolítica, diminuindo tanto o consumo de oxigênio como a geração de NADPH, além da ativação de outros mecanismos que podem determinar sua sobrevivência como a superexpressão de enzimas antioxidantes como SOD e a ativação da via MAPK (CHIKRAMANE *et al.*, 2017). Assim, a formação trombótica poderia simplesmente ser o resultado esperado para o equilíbrio do sistema.

5.2.2 Hipóteses físico-químicas

Ainda não se conhecem os mecanismos de transmissão de informação das substâncias ultradiluídas e submetidas ao processo de dinamização para os sistemas biológicos, embora os processos de sinalização celular sejam sabidamente modificados, em especial, a expressão de genes específicos para certas funções celulares (BIGAGLI *et al.*, 2014; 2016; GUEDES *et al.*, 2018; MARZOTTO *et al.*, 2016; 2020). Contudo, há algumas hipóteses em estudo, como a hipótese dos domínios de coerência, que podem ser avaliados indiretamente por princípios eletrodinâmicos em soluções aquosas (MANZALINI; GALEAZZI, 2019).

A teoria dos campos eletromagnéticos postulou que *clusters* de água podem se organizar em nanoestruturas dipolarizadas nas ultradiluições (MONTAGNIER *et al.*, 2015; Van Wassenhoven *et al.*, 2017). O tamanho de *Clusters* de $^*OH-H_2O_{(n)}$ depende da capacidade de ligações que especificamente a molécula de oxigênio possa efetuar. Pequenos *clusters* podem conter 3 ligações de pontes de hidrogênio e tendem a permanecer na superfície da interface gás-líquidos (AGMON *et al.*, 2016). Essas ligações são fortes e promovem estabilidade e equilíbrio cinético mediante a excessiva pressão interna, como por exemplo, em nanobolhas (AGARWAL *et al.*, 2011). Há especulações de que tais estruturas, que se organizam mediante a agitação de soluções ultradiluídas, carregariam a informação medicamentosa (DEMANGEAT, 2013; 2015).

As nanopartículas são elencadas como uma das hipóteses relacionadas à transmissão da informação de medicamentos homeopáticos. Estão presentes em

soluções aquosas e são oriundas de substâncias de partida como metais, por exemplo. A presença de campo eletromagnético faz-se mister para a associação dessas nanopartículas nas soluções, sendo ainda as subseqüentes diluições e dinamizações responsáveis por alterações físico-químicas das mesmas que não são proporcionais às diluições (KONOVALOV, 2013).

O processo de sucussão (agitação) de soluções aquosas favorece a incorporação e supersaturação de ar nas mesmas, manifestado pela presença de nanobolhas e bolhas de ar. Essas bolhas maiores são incapazes de se ligar a radicais hidrofóbicos das nanopartículas; ao contrário, as nanobolhas são facilitadoras desse processo, aumentando a superfície de absorção e as forças de adesão, de forma a facilitar a formação de uma camada espumosa na superfície da solução com maior concentração de nanopartículas (CHIKRAMANE *et al.*, 2012).

Por sua vez, a contração e o eventual colapso de nanobolhas promovem a liberação de radicais $\cdot\text{OH}$ da superfície ao meio externo, sugerindo uma possível ação biológica dessas estruturas, seja oxidativa ou outra ainda não determinada (LIU *et al.*, 2016). A maior concentração de radicais hidroxila na superfície é caracterizada por grande força de repulsão entre esses radicais que, carregados negativamente, atingem um equilíbrio com a solução aquosa que estão inseridos mediante interação com seus prótons, garantindo estabilidade às nanobolhas (MICHAILEDI *et al.*, 2019) e impedindo a saída de gás de seu interior (SATPUTE; EARTHMAN, 2020).

Nessa perspectiva, a interação entre sistemas biológicos e a transmissão de informação pela solução ultradiluída e agitada também ocorreria mediante ressonância entre ambos, tendo ação no processo de transcrição no núcleo celular (BELLAVITE *et al.*, 2013). Assim, uma inferência especulativa poderia ser feita: o bloqueio de COX-2 e da via NF- κ b em detrimento da ativação de MAPK, conforme sugerido neste trabalho, poderia ser uma mudança de direção entre vias de sinalização intracelular condicionadas a tais mudanças nos domínios de coerência do gel citoplasmático.

Essa mudança no padrão de ressonância estaria associada à seletividade das interações dos sinalizados e determinaria a função biológica exercida por certas proteínas. Evidências de processos ressonantes entre fatores físicos, como a luz e a atividade de peptídeos têm sido descritas por Irena Cosic desde os anos 1990

(COSIC, 1994; COSIC *et al.*, 2016 a, b). Sob esse prisma, a agitação do líquido seria etapa fundamental na geração de possíveis microcampos eletromagnéticos, de diversas frequências, que seriam hipoteticamente capazes de modificar as sinalizações intracelulares (GUEDES *et al.*, 2018).

Além da hipótese dos domínios de coerência, a presença de nanopartículas, observadas em ultradiluições (CHIKRAMANE *et al.*, 2017; HOLIDINO *et al.*, 2017) também vem sendo explorada como uma possível explicação para a transmissão de informação da substância original por medicamentos homeopáticos, incluindo a hipótese da sílica, componente de frascos de medicamentos e possível contaminante dos mesmos. Contudo, em pesquisa recente que avaliou a presença de micropartículas de sílica oriundas da agitação de frascos do medicamento ultradiluído *Arsenicum album* 200 cH, Dalboni *et al.* (2018) atestaram uma redução de IL-6 e do espriamento de macrófagos pela ação do medicamento oriundo de frascos tanto de vidro quanto de sílica, impossibilitando a correlação de efeitos biológicos, sejam específicos ou inespecíficos, com a presença de nanoestruturas de sílica.

A identificação de zonas de maior organização iônica em áreas próximas às superfícies hidrofílicas na água pode permitir avanços no estudo e entendimento das relações de mediadores intracelulares e suas vias de sinalização (CHEN *et al.*, 2012). A zona de exclusão da água, também chamada de quarta fase ou água estruturada (HWANG *et al.*, 2018), é caracterizada por um grau coordenado na disposição molecular, com maior densidade que a água comum e com potencial elétrico estimado em - 200 mV, capaz de exercer influência direta sobre processos biológicos, como o desdobramento protéico (SHARMA *et al.*, 2018) e no próprio citoesqueleto celular (CHEN *et al.*, 2012), influenciando a fagocitose e favorecendo a bioatividade celular com ações anti-oxidantes (HWANG *et al.*, 2017). Tais fatos podem embasar a atividade da água sucussionada, constatada pela redução significativa da concentração extracelular de peróxido de hidrogênio (Figura 5), óxido nítrico (Figura 7), IL 6 (Figura 11), IL 10 (Figura 13) e número absoluto de macrófagos positivos para TLR4 (Figura 15). Em contrapartida, o aumento no número de células que expressam ERO em nível intracelular foi revertido pela presença de LPS na cultura, tomando-se como linha base o comportamento das células não desafiadas (Figura 20), o que sugere haver efeito rebote na presença de ambos os estímulos concomitantes.

Além disso, o surgimento da zona exclusão da água ao redor de nanobolhas é favorecido pela sucussão das soluções e pela ação de medicamentos em pequenas concentrações, como a própria aspirina (0,45 – 4,5 mM), ao passo que grandes doses inibiriam sua formação (SHARMA et al., 2018). A constatação da geração de uma zona de exclusão da água em torno de nanoestruturas tem sido proposta como hipótese explicativa para as ações biológicas de soluções ultradiluídas, mesmo acima do número de Avogadro (ULLMAN, 2021). Supõe-se a existência um processo de sinalização a partir da estruturação da água (ou de algum solvente polar), que serviria como base físico-química para o carregamento de informação, a partir do soluto para os sistemas biológicos sensíveis.

Esses processos de diluição, apesar de diminuírem cada vez mais a presença de substratos, proporcionam a geração de um sistema disperso, excitado e de associações de moléculas de água (YINNON, 2017, 2020), íons *OH (hidroxila) e H^+ (hidrogênio), afetando a bioatividade e as propriedades físico-químicas das mesmas, como a capacidade de interagir com membranas celulares (YINNON, 2020). A alta reatividade do íon *OH está relacionada às pontes de hidrogênio que sua molécula pode estabelecer. A ruptura do emparelhamento de um elétron e as consequentes flutuações em sua dinâmica estrutural estabelecem a rapidez com que prótons de hidrogênio lhe são transferidos, fator determinante na mobilidade desse íon em soluções aquosas (CODORNIU-HERNÁNDEZ; KUSALIK, 2012). Na pré-transição desse estado de valência, o radical *OH adquire características semelhantes ao ânion OH^- . Tomanová *et al.* (2017) descreveram que um único radical *OH pode causar a peroxidação de 34 moléculas de fosfolipídeos.

Na tentativa de inativar esses radicais OH^- decorrentes da provável fagocitose de nanobolhas, os macrófagos RAW 264.7 possam ter diminuído a produção de TNF (ZENG *et al.*, 2017) a fim de potencializar as ações de SOD (as proporções de SOD e OH^- são inversamente proporcionais), em um efeito rebote de auto-regulação. Há uma correlação positiva entre a concentração de radicais *OH da solução aquosa e a densidade numérica de nanobolhas na mesma (LIU *et al.*, 2016).

Uma possível contraprova pode ser o grupo LPS + Asp 15 cH-EF (submetida a corrente elétrica fraca) que, supostamente, apresentando padrões diferentes de coerência e distribuição de cargas, mostrou efeito inibidor do *spreading* em níveis

comparáveis à água sucussionada e à Aspirina 200 µg/ml. Ao mesmo tempo, esse tratamento potencializou os efeitos do LPS sobre a quantidade de células positivas para TLR4 (figura 16). Especula-se, portanto, se a inibição do *spreading* não seria um efeito rebote, auto-regulatório, em contraposição ao aumento do número de células positivas para TLR4, conforme observado.

Experimentos adicionais utilizando corantes solvatocrômicos poderão dar pistas sobre a relevância de tais propriedades físicas da Aspirina 15 cH no estabelecimento dos efeitos descritos sobre os macrófagos (BONAMIN *et al.*, 2020; CARTWRIGHT, 2016, 2017, 2018, 2020)

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstraram que Aspirina 15 cH pode modular manifestações inflamatórias de macrófagos RAW 264.7, aumentando o *spreading* e a expressão de H₂O₂, na mesma magnitude que o LPS. O efeito paradoxal relatado previamente também foi observado, de forma que a associação Aspirina 15 cH e LPS resultasse na anulação dos efeitos de ambos.

A água sucussionada *per se* produz efeitos pró-inflamatórios tanto independentes da presença de LPS, como a inibição na produção de IL-10, TNF- α , H₂O₂ e aumento no *spreading*, quanto dependentes de LPS, como o aumento da atividade oxidativa basal, conforme observado pelo uso da sonda H₂DCF-DA. Esse último efeito pode ser considerado uma etapa possível da regulação da atividade macrofágica pela Aspirina 15 cH.

Os efeitos específicos e paradoxais da Aspirina 15 cH sobre a estimulação de macrófagos por LPS mimetizam os resultados observados anteriormente em modelos de trombogênese, conforme descrito na literatura. Portanto, sugerem a participação de macrófagos na regulação da trombogênese associada à administração de Aspirina 15 cH em roedores.

A Aspirina 200 μ g/ml, por sua vez, mostrou efeitos anti-inflamatórios clássicos, dependentes da estimulação prévia das células com LPS. Não se constatou nenhum paralelo com os efeitos observados para as preparações dinamizadas.

REFERÊNCIAS

- Abaci O, Kilickesmes O. Aspirin resistance: where are we now? *Anadolu Kardiyol Derg* 2013, 13:370-373. doi: 10.5152/akd.2013.107.
- Abhilashaa KV, Sumantha MS, Chaithraa VH, Jacobb SP, Thyagarajanc A, Sahuc RP, et al. p38 MAP-kinase inhibitor protects against platelet-activating factor-induced death in mice. *Free Radic Biol Med* 2019; 143, 275-287. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.019.
- Adler UC. Low-grade inflammation in chronic diseases: na integrative pathophysiology anticipated by homeopathy? *Med Hypotheses* 2011; 76(5):622-626. doi: 10.1016/j.mehy.2010.12.019
- Agarwal A, Ng WJ, Liu Y. Principal of applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment. *Chemosphere* 2011; 84(9):1175-80. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.05.054.
- Agmon N, Bakker HJ, Campen RK, Henchman RH, Pohl P, Roke S, Thämer M, Hassanali A. Protons and hydroxide ions in aqueous systems. *Chem Rev* 2016; 116(13):7642-72. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00736.
- Aguejoui O, Belougne-Malfatti E, Doutremepuich F, Belon P, Doutremepuich C. Thromboembolic complications several days after a single-dose administration of aspirin. *Thromb Res* 1998; 89(3):123-127. doi: 10.1016/s0049-3848(97)00302-2.
- Alcock RF, Reddel CJ, Pennings GJ, Hillis GS, Curnow JL, Brieger DB. The rebound phenomenon after aspirin cessation: the biochemical evidence. *Intern J Card* 2014; 174(2): 376-378. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.03.192.
- Ando Y, Oku T, Tsuji T. Platelet supernatant suppresses LPS-induced Nitric oxide production from macrophages accompanied by inhibition of NF- κ B signaling and increased arginase-1 expression. *Plos ONE* 2016; doi:10.1371/journal.pone.0162208.
- Artyomov M, Sergushichev A, Schilling JD. Integrating Immunometabolism and Macrophage Diversity. *Semin Immunol.* 2016; 28(5): 417–424. doi:10.1016/j.smim.2016.10.004.
- Atkinson L, Yusuf MZ, Aburina A, Ahmed Y, Thomas SG, Naseem KM, Calaminus SDJ. Reversal of stress fibre formation by nitric oxide mediated RhoA inhibition leads to reduction in the height of preformed thrombi. *Scientific Reports* 2018; (8): 3032. Doi: 10.1038/s41598-018-21167-6.
- Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci* 2018; 19, 1801. doi:10.3390/ijms19061801.

Barbieri SS, Petrucci G, Tarantino E, Amadio P, Rocca B, Pesce M, et al. Abnormal megakaryopoiesis and platelet function in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Thromb Haemost* 2015;114(6):1218-29. doi: 10.1160/TH14-10-0872.

Belhassena I, Nouari W, Messaoud A, Nouar M, Brahim M, Lamara SAC, Aribi M. Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoinflammatory disease. *Int Immunopharmacol* 2020; 83:106349. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106349.

Bellavite P, MARZOTTO M, OLIOSSO D, MORATTI E, CONFORTI A. High-dilution effects revisited2 - Pharmacodynamic mechanisms. *Homeopathy* 2013; 103(1):22-43. doi: 10.1016/j.homp.2013.08.002.

Bellavite P. As evidências a favor da homeopatia e as ciências básicas. *Revista de Homeopatia* 2018; 81(3/4):1-15.

Belougne-Malfatti E, Aguejoug O, Doutremepuich F, Belon P, Doutremepuich C. Combination of two doses of acetyl salicylic acid: experimental study of arterial thrombosis. *Thromb Res* 1998; 90(5):215-221. Doi:10.1016/s0049-3848(98)00051-6.

Bian H, Li F, Wang W, Zhao Q, Gao S, Ma J et al. MAPK/p38 Regulation of Cytoskeleton Rearrangement accelerates Induction of macrophage Activation by TLR4, but not TLR3. *Int J Mol Med* 2017, 40:1495-1503. Doi: 10.3892/ijmm.2017.3143.

Bigagli E, Luceri C, Bernardini S, Dei A, Filippini A, Dolara P. Exploring the effects of homeopathic *Apis mellifica* preparations on human gene expression profiles. *Homeopathy*. 2014; 103(2):127-32. doi: 10.1016/j.homp.2014.01.003.

Bigagli E, Luceri C, Dei A, Bernardini S, Dolara P. Effects of Extreme Dilutions of *Apis mellifica* Preparations on Gene Expression Profiles of Human Cells. *Dose Response*. 2016; 14(1):1559325815626685. doi: 10.1177/1559325815626685.

Binker MG, Zhao DY, Pang SJY, Harrison RE. Cytoplasmic Linker Protein-170 Enhances Spreading and Phagocytosis in Activated Macrophages by Stabilizing Microtubules. *J Immunol* 2007, 179(6), 3780-3791. Doi: 10.4049/jimmunol.179.6.3780.

Nagai mydo, Dalboni, LC; Cardoso, TN, Correia MSF, Pinto SAG, Pinto AAG, Coelho, CP, Alvares-Saraiva A, Peres, GB, Lalo MA, Bonamin LV. Effects of Homeopathic Phosphorus on *Encephalitozoon cuniculi*-Infected Macrophages In-Vitro. *Homeopathy* 2019108(03):188-201. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678700>

Bonamin LV, Pedro RPP, Mota HMG, Aguiar MSC, Pinto SAG, Souza J, et al. Characterization of *Antimonium crudum* activity using solvatochromic dyes. *Homeopathy* 2020; 109(2):79-86. doi:1055/s-0039-1697000.

Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox Family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 2014; 76: 208-226. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046.

Burger, W.; Chemnitz, J.M.; Kneissl, G.D.; Rucker, G. Low dose aspirin for secondary cardiovascular prevention: cardiovascular risks after its perioperative withdrawal versus bleeding risks with its continuation. *J. Intern. Med.*, 2005, 257(5), 399-414. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01477.x.

Caillot ARC, Bezerra IL, Palhares LCGF, Santana-Filho AP, Chavante SF, Sasaki GL. Structural Characterization of blackberry wine polysaccharides and immunomodulatory effects on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem* 2018; (257), 143:149. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.02.122.

Calabrese EJ, Giordano J. Ultra Low doses and biological amplification: Approaching Avogadro's number. *Pharmacol Res* 2021, 170. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105738>.

Cambien B, Bergmeier W, Saffaripour S, Mitchell HA, Wagner DD. Antithrombotic activity of TNF- α . *J Clin Invest* 2003; 112:1589-1596. doi: 10.1172/JCI200319284.

Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VI, Pozner RG, Negrotto S, et al. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukoc Biol* 2016; 99(1):153-62. doi: 10.1189/jlb.3A0415-161R.

Carestia A, Meena HA, Olexen CM, Wilczyński JMO, Negrotto S, Errasti AE, et al. Platelets promote macrophage polarization toward pro-inflammatory phenotype and increase survival of septic mice. *Cell reports* 2019; 28(4): 896-908. Doi:10.1016/j.celrep.2019.06.062.

Cartwright SJ. Solvatochromic dyes detect the presence of homeopathic potencies. *Homeopathy*, 2016, 105, 55-65. doi: 10.1016/j.homp.2015.08.002.

Cartwright SJ. Interaction of homeopathic potencies with the water soluble solvatochromic dye bis-dimethylaminofuchson. Part 1: pH studies. *Homeopathy*, 2017, 106, 37-46. doi: 10.1016/j.homp.2017.01.001.

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(1), 19-31. doi: 10.1055/s-0037-1617448.

Cartwright SJ. Homeopathic Potencies May Possess an Electric Field(-like) Component: Evidence from the Use of Encapsulated Solvatochromic Dyes. *Homeopathy*. 2020; 109(1):14-22. doi: 10.1055/s-0039-1693985.

Castro HC, Ferreira BLA; Nagashima T; Schueler A; Rueff C; Camisasca D, et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *Bras Patol Med Lab*, 2006, 5 (42), p. 321-332. Doi: 10.1590/S1676-24442006000500004.

Chao W-W, Chung Y-C, Shih I-P, Wang H-Y, Chou S-T, Hsu C-K. Red bean extract inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation and H₂O₂-induced oxidative stress in

RAW 264.7 macrophages. *J Med Food* 2015; 18(7):724-30. doi: 10.1089/jmf.2014.3353.

Chen CC, Tsai PC, Wei BL, Chiou WF. 8-Prenylkaempferol suppresses inducible nitric oxide synthase expression through interfering with JNK-mediated AP-1 pathway in murine macrophages. *Eur J Pharmacol*. 2008; 590(1-3):430-6. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.05.018.

Chen CS, Chang WJ, Hsu IC, Wu CM, Chin WC. Force Field Measurements within the Exclusion Zone of Water. *J Biol Phys* 2012, 38:113-120. Doi: 10.1007/s10867-011-9237-5.

Chikramane PS, Kalita D, Suresh AK, Kane SG, Bellare JR. Why Extreme Dilutions Reach Non-zero Asymptotes: A Nanoparticle Hypothesis Based on Froth Flotation. *Langmuir* 2012, (28): 45, 15864–15875. doi: <https://doi.org/10.1021/la303477s>

Chikramane PS, Suresh AK, Kane SG, Bellare JR. Metal nanoparticle induced hormetic activation: a novel mechanism of homeopathic medicines. *Homeopathy* 2017; 106 (3) :135–144. doi: 10.1016/j.homp.2017.06.002.

Codorniu-Hernández E, Kusalick PG. Mobility of hydroxyl radicals in aqueous solution via hydrogen transfer. *J Am Chem Soc* 2012; 134(1), 532-538. doi.org/10.1021/ja208874t.

Cosic I. Macromolecular bioactivity: is it resonant interaction between macromolecules? – Theory and applications. *Trans Biom Eng* 1994; 41(12): 1101-1114.

Cosic I, Cosic D, Lazar K. Analysis of Tumor Necrosis Factor Function Using the Resonant Recognition Model. *Cell Biochem Biophys*. 2016; 74(2):175-80. doi: 10.1007/s12013-015-0716-3. (a)

Cosic I, Cosic D, Lazar K. Environmental Light and Its Relationship with Electromagnetic Resonances of Biomolecular Interactions, as Predicted by the Resonant Recognition Model. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(7):647. doi: 10.3390/ijerph13070647. (b)

Dalboni LC, Coelho CP, Pedro RPP, Correia MS, Santana FR, Cardoso TN, Pinto SAG, et al. Biological actions, electrical conductance and silicone-containing microparticles of Arsenicum album prepared in plastic and glass vials. *Homeopathy*, 2018. doi.org/10.1055/s-0038-1670675.

Dei, A. Hormesis and homeopathy: toward a new self-consciousness. Letter to the editor. *Dose-response* 2017; 1-4. doi: 10.1177/1559325817744451

Demangeat JL. Nanosized solvent superstructures in ultramolecular aqueous dilutions: twenty years' research using water proton NMR relaxation. *Homeopathy* 2013; 102(2):87-105. doi: 10.1016/j.homp.2013.01.001.

Demangeat JL. Gas nanobubbles and aqueous nanostructures: the crucial role of dynamization. *Homeopathy* 2015; 104 (2):101–115. doi: 10.1016/j.homp.2015.02.001.

Dixon DA, Tolley ND, Bemis-Standoll K, Martinez ML, Weyrich AS, Morrow JD, et al. Expression of Cox-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *The J Clin Inv* 2006; 10(116): 2727-2738. doi: 10.1172/JCI27209.

Doutremepuich C, Aguejof O, Desplat V, Duprat D, EIZAYAGA FX. Thrombotic events associated to aspirin therapy. *Thrombosis* 2012; 5 p. doi: 10.1155/2012/247363

Doutremepuich C, Aguejof O, Desplat V, Eizayaga FX. Aspirin discontinuation syndromes: clinical implications of basic research studies. *Am J Cardiovasc Drugs* 2013; (6):377-84. doi: 10.1007/s40256-013-0044-1.

Doutremepuich C, Aguejof O, Desplat V, Eizayaga FX. Paradoxical thrombotic effects of aspirin: experimental study on 1000 animals. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2010;10(2):103-110. doi:10.2174/187152910791292510.

Doutremepuich C, Aguejof O, Eizayaga FX, Desplat V. Reverse effect of aspirin: is the prothrombotic effect after aspirin discontinuation mediated by cyclooxygenase 2 inhibition? *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2007; 36(1):40-44. doi: 10.1159/000112638.

Doutremepuich C, De Seze O, Anne MC, Hariveau E, Quilichini R. Platelet aggregation on whole blood after administration of ultra low dosage acetylsalicylic acid in healthy volunteers. *Thromb Res* 1987a; 47(3):373-377.

Doutremepuich C, De Seze O, Le Roy D, Lalanne MC, Anne MC. Aspirin at very ultra low dosage in healthy volunteers: effects on bleeding time, platelet aggregation and coagulation. *Haemostasis.* 1990; 20(2):99-105. doi: 10.1159/000216114

Doutremepuich C, Pailley D, Anne MC, De Seze O, Paccalin J, Quilichini R. Template bleeding time after ingestion of ultra low dosages of acetyl salicylic acid in healthy subjects. Preliminary study. *Thromb Res* 1987b; 48(4):501-504.

Dracoulakis MDA, Gurbel P, Cattaneo M, Martins HS, Nicolau JC, Kalil FILHO R. High residual platelet reactivity during aspirin therapy in patients with non-ST segment elevation acute coronary syndrome: comparison between initial and late phases. *Arq Bras Cardiol* 2019; 113(3):357-363. doi:10.5935/abc.20190146.

Eisenberg MJ, Richard PR, Libersan D, Filion KB. Safety of short-term discontinuation of antiplatelet therapy in patients with drug-eluting stents. *Circulation* 2009; 119(12): 1634–1642. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.813667.

Eizayaga F, Belon P, Desplat V, Aguejof O, Doutremepuich C. Effects of ultra-low-dose aspirin in thrombosis and haemorrhage. *Homeopathy* 2019; 108(3):158-168. doi: 10.1055/s-0038-1677495.

Eizayaga FX, Aguejof O, Belon P, Doutremepuich C. Platelet aggregation in portal hypertension and its modification by ultra-low doses of aspirin. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005; 34(1):29-34. Doi:10.1159/000088545

Eizayaga FX, Aguejof O, Desplat V, Belon P, Doutremepuich C. Modifications produced by indomethacin and L-NAME in the effect of ultralow-dose aspirin on platelet activity in portal hypertension. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35(5):357-63. doi: 10.1159/000097689.

Eizayaga, FX; Aguejof O; Desplat V; Belon P. Modifications produced by selective inhibitors of cyclooxygenase and ultra low dose aspirin on platelet activity in portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2007, 13(38): 5065-5070. doi: 10.3748/wjg.v13.i38.5065.

Farmacopéia Homeopática Brasileira, 2011, 3 ed., 364 p. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259147/3a_edicao.pdf/cb9d5888-6b7c-447b-be3c-af51aaae7ea8

Floyd CN, Ferro A. Antiplatelet drug resistance: molecular insights and clinical implications. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2015; 120:21-27. doi:10.1016/j.prostaglandins.2015.03.011.

Floyd CN, Ferro A. Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacol Ther* 2014;141(1):69-78. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.08.005.

Gerstein NS, Schulman PM, Gerstein WH, Petersen TR, Tawil I. Should more patients continue aspirin therapy perioperatively? *Ann Surg* 2012, 255(5), 811-819. doi:10.1097/sla.0b013e318250504e.

Giacoppo S, Gugliandolo A, Trubiani O, Polastro F, Grassi G, Bramanti P, Mazzone E. Cannabinoid CB2 receptors are involved in the protection of RAW 264.7 macrophages against the oxidative stress: an in vitro study. *Eur J Histochem* 2017, 61(1):2749. doi: 10.4081/ejh.2017.2749.

Guedes JRP, Bonamin LV, Capelozzi VL. Water-related mechanisms proposed for storing and transmitting homeopathic information: putative links with biological responses. *Homeopathy* 2018; 107(3):172-180. doi: 10.1055/s-0038-1642055.

Gugliandolo A, Pollastro F, Grassi G, Bramanti P, Mazzone E. In Vitro Model of Neuroinflammation: Efficacy of Cannabigerol, a Non-Psychoactive Cannabinoid. *Int J Mol Sci* 2018, 19, 1992; doi:10.3390/ijms19071992.

Gunawardena D, Raju R, Münch G. Hydrogen peroxide mediates pro-inflammatory cell-to-cell signaling: a new therapeutic target for inflammation? *Neural Regen Res*, 2019, 14(8): 1430-1437. Doi: 10.4103/1673-5374.253529.

Guo L, Rondina MT. The era of Thromboinflammation: Platelets are dynamic sensors and effector cells during infectious diseases. *Front. Immunol* 2019, 10:2204. doi:10.3389/fimmu.2019.02204.

Haines JM, Lee PM, Hegedus RM, Hwang JK, Court MH. Investigation into the causes of aspirin resistance in healthy dogs. *J Vet Pharmacol Therap* 2019; 42(2): 160-170. doi: 10.1111/jvp.12725.

Hermansson, C.; Lundqvist, A.; Magnusson, L.U.; Ullström, C.; Bergström, G.; Hultén, L.M. Macrophage CD14 expression in human carotid plaques is associated with complicated lesions, correlates with thrombosis, and is reduced by angiotensin receptor blocker treatment. *Int Immunopharmacol.* 2014; 22(2):318-23. doi: 10.1016/j.intimp.2014.07.009.

Hilário MOE, Terreri MT, Len CA. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *Jornal de Pediatria* 2006; 82(5): 206-212. doi:10.2223/JPED.1560.

Ho LJ, Chang DM, Shiao HY, Chen CH, Hsieh TY, Hsu YL, Wong CS, Lai JH. Aspirin Differentially Regulates Endotoxin-Induced IL-12 and TNF-alpha Production in Human Dendritic Cells. *Scand J Rheumatol.* 2001; 30(6):346-52. doi: 10.1080/030097401317148543.

Holandino C, Oliveira AP, Homsani F, *et al.* Structural and thermal analyses of zinc and lactose in homeopathic triturated systems. *Homeopathy* 2017; 106 (3):160–170. doi: 10.1016/j.homp.2017.06.003.

Hwang SG, Lee HS, Lee BC, Bahng GW. Effect of Antioxidant Water on the Bioactivities of Cells. *Int J Cell Biol* 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1155/2017/1917239>.

Hwang SG, Hong JK, Sharma A, Pollack GH, Bahng GW. Exclusion Zone and heterogeneous Water Structure at Ambient Temperature. *PLoS ONE* 2018, 13(4): e0195057. DOI:10.1371/journal.pone.0195057.

Hwang TL, Fang CL, Al-Suwayeh SA, Yang LJ, Fang JY. Activated human neutrophil response to perfluorocarbon nanobubbles: oxygen-dependent and -independent cytotoxic responses. *Toxicol Lett.* 2011; 203(2):172-80. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.03.022.

Idelman G, Smith DLH, Zucker SD. Bilirubin inhibits the up-regulation of inducible nitric oxide synthase by scavenging reactive oxygen species generated by the toll-like receptor 4-dependent activation of NADPH oxidase. *Redox Biology* 2015; 398-408. Doi: 10.1016/j.redox.2015.06.008.

Islam SU, Lee JH, Shehzad A, Ahn E-M, Lee YM, Lee YS. Decursinol angelate inhibits LPS-induced macrophage polarization through modulation of the NK- κ B and MAPK signaling pathways. *Molecules* 2018; 23(8). pii: E1880. doi: 10.3390/molecules23081880.

Jain N, Vogel V. Spatial confinement downsizes the inflammatory response of macrophages. *Nat Mater* 2018; 17(12):1134-1144. doi: 10.1038/s41563-018-0190-6.

Jayakumar T, Huang HG, Hsia CW, Fong TH, Khamrang T, Velusamy M, Manubolu M, Sheu JR, Hsia CH. Ruthenium derivatives attenuate LPS-induced inflammatory responses and liver injury via suppressing NK- κ b signaling and free radical production. *Bioorg Chem* 2020; 96: 103639. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.103639.

Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2009; 102(8): 248-257.

Kasmeridis C, Apostolakis S, Lip GYH. Aspirin and aspirin resistance in coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13(2):242-250. doi: 10.1016/j.coph.2012.12.004.

Knowles RB, Warner TD. Anti-platelet drugs and their necessary interaction with endothelial mediators and platelet cyclic nucleotides for therapeutic efficacy. *Pharmacol Ther* 2019;193:83-90. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.08004.

Ko JH, Yoon SO, Lee HJ, Oh JY. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NF- κ B pathways in autophagy and p62-dependent manners. *Oncotarget* 2017; 8(25):40817-40831. doi: 10.18632/oncotarget.17256.

Konovalov AI. The Formation of Nanosized Molecular Ensembles in Highly Dilute Aqueous Solutions. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Nauk* 2013, 83(12), 1076-1082.

Koskenkorva-Frank TS, WEISS G, KOPPENOL WH. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med* 2013; 65:1174-1194. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.001.

Kotwal GJ, Chien S. macrophage differentiation in normal and accelerated wound healing. *Results Probl Cell Differ* 2017; 62:353-364. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_14.

Laffont B, Corduan A, Rousseau M, Duchez A-C, Lee CHC, Bollard E. Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression. and function. *Thromb Haem*. 2016, 115(2): 311-323.

Lai JL, Liu YH, Liu C, Qi MP, Liu RN, Zhu XF, et al. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Inflammation*. 2017; 40(1):1-12. doi: 10.1007/s10753-016-0447-7.

Lee J, Kim JK, Kim JH, Dunuu T, Park SH, Park SJ *et al*. Recovery time of platelet function after aspirin withdrawal. *Curr Ther Res* 2014; 76: 26-31. doi: 10.1016/j.curtheres.2014.02.002.

Lee KJ, Kim YK, Krupa M, Nguyen NA, Do BH, Chung B, Trang Vu TT, Kim SC, Chloe H. Crostamine stimulates phagocytic activity by inducing nitric oxide and TNF- α via p38 and NF- κ b signaling in RAW 264.7 macrophages. *BMB Rep* 2016; 49(3), 185-190. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.3.271.

Li JL, Zarbock A, Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. *J Exp. Med* 2017; 214 (8), 2193-2204. doi: 10.1084/jem.20170879.

Lichtenberger LM, Fang D, Bick RJ, Poindexter BJ, Phan T, Bergeron AL, Pradhan S, Dil EJ, Vijayan KV. Unlocking aspirin's chemopreventive activity: Role of irreversibly inhibiting platelet cyclooxygenase-1. *Cancer Prev Res (Phila)* 2017; 10(2): 142-152. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-16-0241.

Liu Y, Silian F, Li X, Feng J, Du J, Guo L, et al. Aspirin inhibits LPS-induced macrophage activation via the NF- κ b pathway. *Scientific Reports* 2017a, 7:11549. doi: 10.1038/s41598-017-10720-4.

Liu N, Cui C, Sun Y, Zhang F, Wang S, Su G, Cai X. Hydrogen peroxide promotes the expression of angiopoietin-like 4 in RAW 264.7 macrophages via MAPK pathways. *Molecular Medicine Reports* 2017b; 16: 6128-6133. doi: 10.3892/mmr.2017.7365.

Liu CP, Zhang X, Tan QL, Xu WX, Zhou CY, Luo M, et al. NF-KB pathways are involved in M1 polarization of RAW 264.7 macrophage by polyporus polysaccharide in the tumor microenvironment. *Plos one* 2017c, Nov 20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188317>

Liu S, Oshita S, Thuyet DQ, Saito M, Yoshimoto T. Antioxidant Activity of Hydrogen Nanobubbles in Water with Different Reactive Oxygen Species both in Vivo and in Vitro. *Langmuir*. 2018; 34(39):11878-11885. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02440.

Liu S, Oshita S, Kawabata S, Makino Y, Yoshimoto T. Identification of ROS Produced by Nanobubbles and Their Positive and Negative Effects on Vegetable Seed Germination. *Langmuir* 2016; 32: 11295–11302. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b01621

Lordkipanidzé, M.; Diodatti, J.G.; Pharand, C. Possibility of a rebound phenomenon following antiplatelet therapy withdrawal: a look at the clinical and pharmacological evidence. *Pharmacol. Ther* 2009; 123(2):178-186. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.03.019.

Lucotti S, Cerutti C, Soyer M, Gil-Barnabè AM, Gomes AL, Allen PD, et al. Aspirin blocks formation of metastatic intravascular niches by inhibiting platelet-derived cox-1/thromboxane A₂. *J Clin Invest* 2019; 129(5):1845-1862. doi: 10.1172/JCI121985.

Luque MCA, Galuppo MK, Capelli-Peixoto J, Stolf BS. CD100 effects in macrophages and its roles in atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* 2018; 5:136. doi: 10.3389/fcvm.2018.00136.

Manzalini A, Galeazzi B. Explaining homeopathy with quantum electrodynamics. *Homeopathy* 2019; 108(3):169-176. doi: 10.1055/s-0039-1681037.

Marques FM, Figueira MM, Schmitt EFP, Kondratyuk TP, Endringer DC, Scherer R, Fronza M. In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ b signaling pathway. *Inflammopharmacology* 2019; 27(2): 281-289. doi: 10.1007/s10787-018-0483-z.

Marzotto, M.; Bonafini, C.; Oliosio, D.; Baruzzi, A.; Bettinetti, L.; Di Leva, F.; Galbiati, G.; Bellavite, P. Arnica montana Stimulates Extracellular Matrix Gene Expression in a Macrophage Cell Line Differentiated to Wound-Healing Phenotype. *PLoS One* 2016; 10;11(11). doi: 10.1371/journal.pone.0166340.

Marzotto M, Arruda-Silva M, Bellavite P. Fibronectin Gene Up-regulation by Arnica montana in Human Macrophages: Validation by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Homeopathy*; 2020. doi: 10.1055/s-0040-1708044. E-Pub ahead of print.

Mclewee N, Archer T, Wills R, Mackin A, Thomason J. Effects of aspirin dose escalation on platelet function and urinary thromboxane and prostacyclin levels in normal dogs. *J vet Pharmacol Therap* 2017; 41(1): 60-67. doi: 10.1111/jvp.12432.

Mcneil JJ, Wolfe R, Woods RL, Tonkin AM, Donnan GA, Nelson MR et al. Effect of Aspirin on Cardiovascular Events and Bleeding in the Healthy Elderly. *The N Engl J Med*, 2018; 379(16): 1509-1518. doi: 10.1056/NEJMoa1805819.

Michailidi ED, Bomis G, Varoutoglou A, Kyzas GZ, Mitrikas G, Mitropoulos AC, Efthimiadou EK, Favvas EP. Bulk nanobubbles: production and investigation of their formation/stability mechanism. *J Colloid Interface Sci* 2020; 22(564): 371-380. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.12.093>

Moghaddam AS, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili AS, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018; 233(9):6425-6440. doi: 10.1002/jcp.26429 2018.

Montagnier L, Del Giudice E, Aïssa J, *et al.* Transduction of DNA information through water and electromagnetic waves. *Electromagn Biol Med* 2015; 34:106–112. doi: 10.3109/15368378.2015.1036072.

Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, Hoesel B, Schoergenhofer C, Datler H, et al. Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Front Immunol* 2019; 10:85. Doi: 10.3389/fimmu.2019.00085.

Nayak MK, Dash A, Singh N, Dash D. Aspirin delimits platelet life span by proteosomal inhibition. *Plos One* 2014; 9(12).doi: 10.1371/journal.pone. 0105049.

Pedro, RRP. Caracterização físico-química e ultra-estrutural do medicamento homeopático Antimonium crudum. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2017. 45p.

Pettersen AA, Arnesen H, Seljeflot I. A brief review on high on-aspirin residual platelet reactivity. *Vascul Pharmacol*, 2015; 67-69:6-9. doi:10.1016/j.vph.2015.03.018.

Pierre S, Linke B, Suo J, Tarighi N, Del Turco D, Thomas D, et al. GPVI and thromboxane receptor on platelets promote proinflammatory macrophage phenotypes

during cutaneous inflammation. *J Invest Derm* 2017; 137: 686-695. doi: 10.1016/j.jid.2016.09.036.

Pircher J, Engelmann B, Massberg S, Schuz C. Platelet-Neutrophil crosstalk in atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2019; 119(8): 1274-1282. doi:10.1055/s-0039-1692983.

Procter NE, Hurst NL, Nooney VB, Imam H, De Caterina R, Chirkov YY, Horowitz JD. New developments in platelet cyclic nucleotide signalling: therapeutic implications. *Cardiovasc Drugs Ther* 2016; 30(5):505-513. doi:10.1007/s10557-016-6671-4.

Raychaudhuri B, Fisher CJ, Farver CF, Malur A, Drazba J, Kavuru MS, Thomassen MJ. Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Cytokine* 2000; 12(9):1348-55. doi: 10.1006/cyto.2000.0721.

Rószter T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effectos mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015; 2015:816460. doi: 10.1155/2015/816460.

Rukoyatkina N, Shpakovaa V, Panteleevb M, Kharazovac A, Gambaryana S, Geiger J. Multifaceted effects of arachidonic acid and interaction with cyclic nucleotides in human platelets. *Thromb Res* 2018; (171) 22–30. doi: 10.1016/j.thromres.2018.09.047.

Sakamoto T, Ohashi W, Tomita K, Hattori K, Matsuda N. Anti-inflammatory properties of cilostazol: Its interruption of DNA binding activity of NF-KB from the Toll-like receptor signaling pathways. *Int Immunopharmacol* 2018, 62: 120-131.

Santana, F.R.; Dalboni, L.C.; Nascimento, K.F.; Konno, F.T.; Alvares-Saraiva, A.M.; Correia, M.S.F.; et al. High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage – *Leishmania (L.) amazonensis* interaction *in vitro*. *Cytokine* 2017; 92:33-47. doi: 10.1016/j.cyto.2017.01.004.

Santilli F, Rocca B, Cristofaro R, Lattanzio S, Pietrangelo L, Habib A, et al. Platelet cyclooxygenase inhibition by low-dose aspirin is not reflected consistently by platelet function assays. *J Am Coll Card* 2009; 53(8): 667-677. doi: 10.1016/j.jacc.2008.10.047.

Satpute PA, Earthman JC. Hydroxyl Ion Stabilization of Bulk Nanobubbles Resulting from Microbubble Shrinkage. *J Colloid Interface Sci.* 2021, 584: 449-455. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.09.100>.

Seker S, Güven C, Akçakaya H, Bahtiyar N, Akbas F, Onaran I. Evidence that Extreme Dilutions of Paclitaxel and Docetaxel Alter Gene Expression of in Vitro Breast Cancer cells. *The Faculty of Homeopathy* 2018. Disponível em <https://doi.org/10.1055/s-0037-1618585>

Sharma A, Adams C, Cashdollar BD, Li Z, Nguyen NV, Sai H et al. Effect of Health-promoting Agents on Exclusion-Zone Size. *Dose-response* 2018. Disponível em <https://doi.org/10.1177/1559325818796937>

Silva AIM. A potencial utilização do ácido acetilsalicílico como anticancerígeno. (Dissertação). Universidade do Porto, Portugal 2014.

Silva Junior IA, Stone SC, Rossetti RM, Jancar S, Lepique AP. Modulation of Tumor-Associated Macrophages (TAM) Phenotype by Platelet-Activating Factor (PAF) Receptor. *J Immunol Res*. 2017, 5482768, 10 p. doi: 10.1155/2017/5482768.

Silva SMM, Costa CRR, Gelfuso GM, Guerra ENS, Nóbrega YKM, Gomes SM, et al. Wound Healing Effect of Essential Oil Extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) Leaves. *Molec* 2019; 24 (2); doi:10.3390/molecules24010002.

Stocker TJ, Pircher J, Skenderi A, Erlich A, Eberle C, Megens RTA, et al. The actin regulator Coronin -1A modulate platelet shape change and consolidates arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2018; 118(12): 2098-2111. doi: 10.1055/s-0038-1675604.

Sutcliffe, P.; Connock, M.; Gurung, T.; Freeman, K.; Johnson, S.; Ngianga-Bakwin, K. Aspirin in primary prevention of cardiovascular disease and cancer: a systematic review of the balance of evidence from reviews of randomized trials. *PLoSOne*. 2013;8(12):1-1. doi: 10.1371/journal.pone.0081970.

Takahashi M, Chiba K, Li P. Free-radical Generation from Collapsing Microbubbles in the absence of a Dynamic Stimulus. *J Phys Chem* 2007, 111: 1343-1347.

Teixeira, M.Z. Pesquisa clínica em homeopatia: evidências, limitações e projetos. *Pediatria (São Paulo)* 2008;30(1):27-40.

Tomanová K, Precek M, Múcka V, Vysin L, Juha L, Cuba V. At the crossroad of photochemistry and radiation chemistry: formation of hydroxyl radicals in diluted aqueous solutions exposed to ultravioleta radiation. *J Phys Chem* 2017; 19: 29402-29408. doi:10.1039/C7CP05125E.

Ullman D. Exploring Possible Mechanism of Hormesis and Homeopathy in the Light of Nanopharmacology and Ultra-High Dilutions. *Dose-response* 2021. Disponível em <https://doi.org/10.1177/15593258211022983>.

Van Wassenhoven M, Govens M, Henry M, Capieaux E, Devos P. Nuclear Magnetic Resonance characterization of traditional homeopathically manufactured copper (*Cuprum metallicum*) and plant (*Gelsemium sempervirens*) medicines and controls. *Homeopathy* 2017; 106(4), 223-239. doi: 10.1016/j.homp.2017.08.001.

Vianna, C.A.; González, D.A.; Matijasevich, A. Utilização de ácido acetilsalicílico (AAS) na prevenção de doenças cardiovasculares: um estudo de base populacional. *Cad. Saúde Pública*, jun 2012, Rio de Janeiro, 28(6):1122-1132. Doi: 10.1590/S0102-311X2012000600011.

Vuong LD, Nguyen QN, Truong VL. Anti-inflammatory and anti-oxidant effects of combination between sulforaphane and acetaminophen in LPS-stimulated RAW 264.7

macrophage cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2019;41(3): 413-419. doi: 10.1080/08923973.2019.1569049.

Wu YS, Nan FH, Huang SL, Hsiao CM, Lai KC, Lu CL, Chen SN. Studies of macrophage cellular response to the extracellular hydrogen peroxide by tilapia model. *Fish and Shellfish Immun* 2014; 36: 459-466. doi:10.1016/j.fsi.2013.12.020

Yassin AS, Abubakar H, Mishra T, Subahi A, Hartman M, Ahmed A, Ibrahim W, et al. Aspirin Resistance: cardiovascular risk game changer. *Am J Ther* 2018; 26(5):593-599. doi: 10.1097/MJT. 0000000000000780.

Yinnon TA. Liquids prepared by serially diluting and vigorously shaking of aqueous solutions: unveiling effects of the solute on their properties. *Water* 2020; 10: 115-134. doi: 10.14294/WATER.2019.2.

Yinnon TA. Very diluted aqueous solutions – structural and electromagnetic phenomena. *Water*, 2017; 9: 28-66. doi: 10.14294/WATER.2017.4.

Yinnon TA. Liquids Prepared by Serially Diluting and Vigorously Shaking of Aqueous Solutions: Unveiling Effects of the Solute on their Properties. *Water*, 2020; 10:115-134. doi: 10.14294/2019.2.

Yusuf MZ, Raslan Z, Atkinson L, Aburima A, Thomas SG, Naseem KM, Calaminus SDJ. Prostacyclin reverses platelet stress fibre formation causing platelet aggregate instability. *Scientific Reports* 2017; (7):5582. Doi: 10.1038/s41598-017-05817-9.

Zeng L, Xia T, Hu W, Chen S, Chi S, Lei Y, Liu Z. Visualizing the regulation of hydroxyl radical level by superoxide dismutase via a specific molecular probe. *Anal Chem* 2017; 90(2): 1317-1324. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04191.

Zhang P, Wu C, Huang XH, Shen CL, Li L, Zhang W, Yao CZ. Aspirin suppresses TNF- α -induced MMP-9 via NF- κ B and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells. *Exp Ther Med* 2017; 14: 5597-5604. Doi: 10.3892/etm.2017.5252.

Zhu M, Li Y, Sun K. MicroRNA-182-5p inhibits inflammation in LPS-treated RAW264.7 cells by mediating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018; 11(12):5725-5734. eCollection 2018.

Zhu Y, Dong Y, Wu L, Deng F. Changes of inflammatory mediators and oxidative stress indicators in children with Henoch-Schönlein purpura and clinical effects of hemoperfusion in the treatment of severe Henoch-Schönlein purpura with gastrointestinal involvement in children. *BMC Pediatr*. 2019; 19(1):409. doi: 10.1186/s12887-019-1802-2