



**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOMODULADORA DE LA  
“*ECHINACEA ANGUSTIFOLIA*” HOMEOPATIZADA EN CULTIVO DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE PERIFÉRICA HUMANA**

**MAGDA CAROLINA FULA COBOS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
MAESTRIA EN MEDICINA ALTERNATIVA – HOMEOPATIA  
BOGOTA  
2011**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOMODULADORA DE LA  
“*ECHINACEA ANGUSTIFOLIA*” HOMEOPATIZADA EN CULTIVO DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE PERIFÉRICA HUMANA**

**MAGDA CAROLINA FULA COBOS**

**Trabajo de Grado para obtener el título de Magister en Medicina  
Alternativa con énfasis en Homeopatía**

**Director: Dr. Jorge Eduardo Caminos. Coordinador Departamento  
Bioquímica. Facultad Medicina Universidad Nacional de Colombia.**

**Codirector: Dra. Gloria Casas. Magister en medicina Alternativa. Área  
Homeópata. Facultad Medicina Universidad Nacional de Colombia.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MAESTRIA EN MEDICINA ALTERNATIVA – HOMEOPATIA**

**BOGOTA**

**2011**

***A Dios, porque sin El nada es posible, a mi esposo, hija y a mis amados padres.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a cada uno de mis maestros, compañeros y personas que me han acompañado a lo largo de estos 2 años de maestría, he aprendido a ver la medicina con otros ojos, ha ser mejor profesional y persona. Muchas gracias.

## CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	13
2. JUSTIFICACION	15
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GENERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MARCO TEORICO	18
4.1 CITOQUINAS	18
4.1.2 <i>Clasificación de las citoquinas</i>	19
4.2 ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN DE “ECHINACEA”	22
4.3 HOMEOPATÍA	23
4.3.1 Leyes de la homeopatía	23
4.4 EXPERIMENTACIÓN PATOGENÉTICA DE “ECHINACEA”	25
5 MATERIALES Y METODOS	27
5.1 PREPARACION DE LA FORMULACION HOMEOPATICA DE “ECHINACEA ANGUSTIFOLIA”	27
5.2 OBTENCION DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA	27
5.2.1 Evaluación del efecto de “ <i>Echinacea angustifolia</i> ” sobre la viabilidad celular de las células mononucleares de sangre periférica de individuos sano.	29

5.2.2	Evaluación de los niveles de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica tratadas con " <i>Echinacea angustifolia</i> ".	30
5.3	ANALISIS ESTADISTICO	30
6.	RESULTADOS	31
6.1	VIABILIDAD DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA DE INDIVIDUOS SANOS AL APLICA "ECHINACEA ANGUSTIFOLIA".	31
6.2	CUANTIFICACION DE LOS NIVELES DE LAS CITOQUINAS MEDIDAS AL APLICAR "ECHINACEA ANGUSTIFOLIA" HOMEOPATIZADA A LA 30 CH Vs CONTROL.	31
6.3	RESPUESTA INDIVIDUAL DE LAS CITOQUINAS EN CELULAS MONONUCLEARES DE CADA PACIENTE AL APLICAR "ECHINACEA ANGUSTIFOLIA" HOMEOPATIZADA A LA 30 CH Vs CONTROL.	32
7.	<i>DISCUSION</i>	33
8.	<i>CONCLUSIONES</i>	36
9.	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	37

## LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo No 1. Consentimiento informado	41
Anexo No 2. Especificaciones del fabricante del kit "Cytokine Human Panel" Invitrogen.	42

## FIGURAS

	Pag.
FIGURA No 1. Efecto “in vitro” de “ <i>Echinacea</i> ” <i>homeopatizada a la 30 CH</i> sobre la viabilidad de células mononucleares de <i>sangre periférica</i> .	43
FIGURA No2. Efecto de “in vitro” de “ <i>Echinacea</i> ” <i>homeopatizada la 30 CH</i> sobre los niveles de citoquinas en células mononucleares de <i>sangre periférica</i> .	44
FIGURA No3. Curva de calibración del equipo Luminex para el Factor de Necrosis tumoral.	45
FIGURA No4. Respuestas individuales de las células mononucleares aislada de la <i>sangre periférica</i> expuestas a “ <i>Echinacea</i> ” <i>homeopatizada a la 30 CH</i> de los pacientes 1 a 10.	46



<b>TABLAS</b>	<b>Pag.</b>
TABLA No1. Efecto “in vitro” de “ <i>Echinacea</i> ” <i>homeopatizada a la 30 CH</i> sobre la viabilidad de células Mononucleares desangre periférica.	48
TABLA No2 Respuesta individual de la IL 1 $\beta$ en células mononucleares aislada de la sangre periférica de cada paciente expuestas a “ <i>Echinacea</i> ” <i>homeopatizada a la 30</i> CH vs control.	49
TABLA No3 Respuesta individual de la IL 6 en células mononucleares aislada de la sangre periférica de cada paciente expuestas a “ <i>Echinacea</i> ” <i>homeopatizada a la 30</i> CH vs control.	49
TABLA No4 Respuesta individual de la IL 8 en células mononucleares aislada de la sangre periférica de cada paciente expuestas a “ <i>Echinacea</i> ” <i>homeopatizada a la 30</i> CH vs control.	50
TABLA No5. Respuesta individual de la IL 10 en células mononucleares aislada de la sangre periférica de cada paciente expuestas a “ <i>Echinacea</i> ” <i>homeopatizada a la 30</i> CH vs control.	50

## LISTA DE SIGLAS

CH:	Centesimal Hahnemanniana
Ig:	Inmunoglobulina
IL 1 $\beta$	Interleuquina 1 $\beta$
IL 6:	Interleuquina 6
IL 8:	Interleuquina 8
IL10:	Interleuquina 10
TNF:	Factor de Necrosis Tisular
Th1:	Linfocitos T Helper 1
Th2:	Linfocitos T Helper 2
CMH:	Complejo mayor de Inmunohistocompatibilidad.

## RESUMEN

### EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOMODULADORA DE LA “*ECHINACEA ANGUSTIFOLIA*” HOMEOPATIZADA EN CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE PERIFÉRICA HUMANA

**Introducción:** La “*Echinacea angustifolia*”, es uno de los medicamentos herbolarios más representativos y utilizado en todo el mundo. Se han realizado diferentes estudios para valorar su respuesta frente al sistema inmune, observándose que actúa sobre la mayoría de células inmunitarias, provocando una modulación en su respuesta. Estos estudios se han realizado con “*Echinacea*” como medicamento fitoterapéutico, no se han realizado estudios en su presentación homeopática. El objetivo de este estudio es evaluar la respuesta de el sistema inmune frente a la “*Echinacea*” homeopatzada.

**Materiales y Métodos:** La cuantificación de los niveles de las citoquinas IL1 $\beta$ ., IL 6, IL 8, IL 10, FNT, se determinaron sobre células mononucleares en sangre periférica humana tratadas con “*Echinacea angustifolia*” homeopátizada a la potencia 30 CH, mediante el ensayo “Cytokine Human Panel” Invitrogen en el equipo Luminex 200.

**Resultados:** Con respecto a la viabilidad celular se encontró una proliferación de las células mononucleares de hasta un 40 % mas en comparación que el control, esto demostró que si hay efectos mitogénicos de la “*Echinacea*” homeopatzada sobre las células mononucleares, lo que puede concluir que si hay una modulación positiva a nivel del sistema inmune comparables con su la presentación fitoterapéutica. Los resultados del análisis de citoquinas IL1 $\beta$ .IL 6, IL 8, IL 10, FNT, medidos en el equipo de Luminex, demostró que los mecanismos inmonomoduladores de la “*Echinacea*” homeopatzada posiblemente no están asociadas a estas citoquinas o que su estimulación se de a otras potencias.

**Conclusiones:** Los resultados del estudio mostraron un efecto mitogénico a nivel de las células mononucleares expuestas a la “*Echinacea angustifolia*” homeopatzada, este estudio, deja la puerta abierta, para la realización de nuevos proyectos.

**Palabras claves:** *Echinacea angustifolia* homeopátizada, células mononucleares, citoquina.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE RESPONSE IMMUNOMODULATORY "ECHINACEA ANGUSTIFOLIA" HOMEOPATHIC GROWING MONONUCLEAR CELLS IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD

**Introduction:** "Echinacea angustifolia" is one of the most representative and herbal medicines used around the world. There have been several studies to assess their response to the immune system, noting that most acts on immune cells, causing a modulation in the response. These studies have been conducted with "Echinacea" as herbal medicinal products have not been studied in homeopathic presentation. The objective of this study is to evaluate the immune response against the "Echinacea" homeopathic.

**Materials and Methods:** Quantification of the levels of cytokines IL1  $\beta$  , IL 6, IL 8, IL 10, TNF, were determined on peripheral blood mononuclear cells treated with human "Echinacea angustifolia" homeopathic potency to 30 CH, by the essay "Human Cytokine Panel" on your computer Invitrogen Luminex 200.

**Results:** With respect to cell viability was found mononuclear cell proliferation up to 40% compared to the control, this showed that if the mitogenic effects of "Echinacea" homeopathic on mononuclear cells, which can be concluded if there is a positive modulation of the immune system level comparable with phytotherapeutic presentation. The results of the analysis of cytokine IL1  $\beta$  , IL-6, IL 8, IL 10, TNF, measured in Luminex's team showed that the mechanisms in monomoduladores "Echinacea" homeopathic possibly not associated with these cytokines or their stimulation were of other powers.

**Conclusions:** The results showed a mitogenic effect on the level of mononuclear cells exposed to "Echinacea angustifolia" homeopathic, this study opens the door for the realization of new projects.

**Keywords:** homeopathic Echinacea angustifolia, mononuclear cells, cytokines.

## 1. INTRODUCCION

La medicina homeopática apareció en Europa a finales del siglo XVIII, fue creada por el doctor Samuel Hahnemann, etimológicamente viene de las raíces griegas *homeois* que equivale a semejante y *pathos* que equivale a padecimiento o enfermedad (1).

La Homeopatía es un sistema medico complejo, que parte de los rasgos de la teoría vitalista, donde, se encamina el problema de salud, desde, un enfoque integrador, que ve al ser humano como un todo, donde, se observa, lo físico, lo psíquico y la energía vital (1,2). Este sistema esta constituido por tres disciplinas, la parte doctrinal, donde, se encuentra los principios teóricos de la homeopatía dada por sus leyes, la parte semiológica donde se encuentra el arte de interpretar los síntomas y signos del paciente encontrados dentro de la consulta y un método terapéutico, las anteriores tres disciplinas son interpretadas y realizadas según los criterios establecidos por su fundador el doctor Hahnemann, en su obra el Organon y en la materia medica, estas son propias y únicas de la medicina homeopática, lo que hacen que sea un sistema medico único y diferente, a otros, sistemas médicos complejos (1,3).

En este estudio se va a evaluar una sustancia de origen vegetal la "*Echinacea angustifolia*". Esta, es uno de los medicamentos herbolarios más representativos y utilizado en todo el mundo. Se han realizado diferentes estudios para valorar su respuesta frente al sistema inmune, observándose que actúa sobre la mayoría de células inmunitarias, provocando una modulación en su respuesta (4-14). Estos estudios se han realizado con "*Echinacea*" como medicamento fitoterapéutico, no se han realizado estudios en su presentación homeopática, por lo cual, se desconoce, desde, el punto de vista de la biología molecular, si al aplicar, esta, en su presentación, como, medicamento homeopático a una célula, en este caso, a células mononucleares, presente algún tipo de respuesta similar a la presentada con la "*Echinacea*" como

medicamento fitoteraputico. Para poder evaluar esta respuesta se utilizaran unas de las citoquinas mas evaluadas dentro de los estudios descritos anteriormente (4-14).

Todo lo anterior, conlleva a preguntarse, cual será la respuesta de las citoquinas IL1 $\beta$ , IL 6, IL 8, IL 10, FNT, en cultivo de células mononucleares en sangre periférica humana al exponerse a la “*Echinacea Angustifolia*” homeopatizada a la potencia 30 CH.

## 2. JUSTIFICACION

La “*Echinacea*” es una de los medicamentos fitoterapeúticos tradicionales en América, ha sido empleado durante muchos años por indígenas Norte Americanos como un elixir para una variedad de enfermedades que incluyen infecciones, traumatismos, inflamación, fiebre, tratamiento de resfriados y enfermedades de tracto respiratorio superior (4).

Se ha constituido en una de las plantas medicinales de mayor importancia en el mercado de hierbas europeas, Canadienses y Estadunidenses, está entre las más utilizadas como medicina herbolaria o fitoterapéutica, representando un 9,9% de la industria de las hierbas medicinales. Existen tres especies predominantemente estudiadas de “*Echinacea: angustifolia, purpurea y pallida*” (4,5).

Se han realizados diversos estudios “*in vitro*” con células mononucleares de origen humano y animal (4-14). Estos estudios se realizaron con las diferentes variedades de “*Echinacea*” preparada de manera fitoterapéutica, para evaluar la respuesta inmunomoduladora de estas células frente a este medicamento. Se observó que activan la respuesta celular inespecífica, la inmunidad humoral y el sistema de complemento, aumento de la producción y la actividad de los leucocitos, linfocitos y monocitos, así como, de las citoquinas, entre las cuales están, la interleuquina 1 Beta (IL-1  $\beta$ ), interleuquina 6 (IL- 6), interleuquina 11 (IL -11), el interferón gamma (INF-  $\gamma$ ), el factor de necrosis del tumoral (TNF). Se observó aumento la actividad fagocitaria del linfocito citolítico natural (NK), macrófagos y neutrófilos del sistema retículo-endotelial. Estos son algunos de los estímulos inmunomoduladores encontrados (4-14).

En los anteriores estudios se confirmó la acción inmunomoduladora de la “*Echinacea*”, utilizada como medicamento fitoterapéutico. No se han encontrado en la literatura estudios que evalúen la respuesta de las citoquinas a la “*Echinacea*” utilizada como medicamento homeopatizado, por esto la importancia de este estudio, ya que contribuirá al conocimiento de la respuesta inmunomoduladora de la misma y al desarrollo de la investigación homeopática, que mostrara si la “*Echinacea*” homeopatizada, tiene efectos inmunomoduladores, el tipo de respuesta sobre este, si estos pueden llegar a ser comparados con los encontrados a nivel fitoterapéutico .

Para este estudio, se utilizará la potencia 30 CH, ya que esta es la potencia utilizada por Hahnemann, para realizar los estudios de experimentación pura como lo expresa el parágrafo 128 del Organon (3).

En este estudio, se evaluará la respuesta inmunomoduladora de la "*Echinacea angustifolia*" homeopatizada a la potencia 30 CH sobre las citoquinas IL1  $\beta$ , IL 6, IL 8, IL 10, FNT en células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos medida mediante el ensayo "Cytokine Human Panel" Invitrogen en el equipo Luminex 200



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto inmunomodulador de la *Echinacea angustifolia* homeopatizada a la potencia 30 CH en cultivo de células mononucleares obtenidas de sangre periférica de pacientes sanos medida mediante el ensayo “Cytokine Human Panel” Invitrogen en el equipo Luminex 200.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Determinar mediante el ensayo “Cytokine Human Panel” Invitrogen en el equipo Luminex 200, el efecto en la regulación de las citoquinas proinflamatorias (IL 1  $\beta$ , IL 6, IL 8, IL 10, FNT), al utilizar *Echinacea angustifolia* homeopatizada en cultivo de células mononucleares obtenidas de sangre periférica de pacientes sanos.

3.2.2 Comparar si existe diferencia en la respuesta inmunomoduladora de la citoquinas proinflamatorias al utilizar *Echinacea angustifolia* homeopatizada, frente a los estudios ya reportados con *Echinacea* fitoterapéutica.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 LAS CITOQUINAS

La inflamación, es una respuesta esencial para la conservación de los organismos frente a la agresión, por tanto la ausencia de esta puede ser mortal (15). A su vez, La perpetuación de la inflamación es un riesgo debido a que puede dañar el tejido y provocar necrosis celular, por esto, los componentes de la respuesta inmunológica se aseguran de su resolución (16). En este estudio se decidió la experimentación sobre linfocitos T, ya que estos por medio de las citoquinas ejercen acciones muy importantes en las respuestas inmunomoduladora.

Las citoquinas son un grupo de proteínas reguladoras. Son macromoléculas de comunicación intercelular que intervienen en el comportamiento biológico de la célula (15).

Las citoquinas, son importantes en la regulación y en la activación a nivel intercelular. Inicialmente se creía que su función era solo a nivel antiviral, pero se han ido conociendo todas sus funciones, se considera que son primordiales para la respuesta inflamatoria innata y adaptativa, en el crecimiento y diferenciación celular, en el proceso de apoptosis, de angiogénesis y en los procesos de reparación (11). Tienen otras funciones importantes, en el desarrollo de respuestas inmunes específicas, induciendo el tráfico de las células dendríticas, los linfocitos Th1, Th2 y B en el tejido linfoide secundario (17). Las citoquinas proporcionan un vínculo a nivel molecular entre los diferentes sistemas, son vitales para el mantenimiento fisiológico y ofrecen apoyo en la comunicación intercelular (11).

Las citoquinas, se unen a receptores específicos en la membrana de la célula, esto desencadena la transducción de señales que llevan a la expresión génica o a la proliferación de estas células. La secreción de las citoquinas, es un suceso corto y limitado, no se almacenan, su síntesis se inicia con una transcripción génica transitoria, una vez sintetizadas, se secretan rápidamente, su acción es corta y puede ser autocrina, yuxtacrina o paracrina, en pocas oportunidades puede ser endocrina; puede, actuar en diferentes tipos celulares y provocar diferentes respuestas, esto conlleva a que pueda tener funciones sinérgicas o antagónicas, la acción de una citoquina puede aumentar o disminuir la expresión del receptor de si misma o de otra citoquina, lo que constituye un elemento regulador(15).

Durante las reacciones inflamatorias, los leucocitos migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia el tejido extravascular donde realizan diferentes funciones biológicas, este proceso es controlado por citoquinas las cuales tienen funciones muy específicas, controlando la activación de estas células, provocando un efecto inmunomodulador en las mismas (17).

La alteración de producción de citoquinas se ha visto asociado a diferentes enfermedades, como, trastornos neuropsiquiátricos, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, trastorno obsesivo-compulsivo y anorexia nerviosa (11).

Las citoquinas también parecen desempeñar un papel en la depresión, la esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer. Además de la participación en los trastornos neuropsiquiátricos, las citoquinas tienen actividad en todos los sistemas del cuerpo. Como resultado del creciente conocimiento de la actividad de las citoquinas, su alteración como posible etiología de múltiples enfermedades y de la orientación de sus receptores, se pueden encontrar en ellas un potencial terapéutico a nivel molecular. Actualmente, hay estrategias farmacológicas que incluyen citoquinas (11).

La utilización de las citoquinas en terapéutica se inició en 1986 cuando la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) aprobó el antagonista del interferón para el tratamiento de la leucemia de células pilosas y en el 2001, un antagonista del factor de necrosis tumoral, clave en la patogénesis de la artritis reumatoide, esto fue descrito como uno de los avances más importantes en el manejo de esta enfermedad. Además, la IL-1 $\beta$  y un antagonista del TNF ofrecen opciones para el tratamiento de enfermedades periodontales. Existen, nuevos enfoques en el tratamiento del asma, inhibiendo los linfocitos Th2, lo que disminuye la expresión de las citoquinas, disminuyendo los niveles de producción de la inmunoglobulina E (IgE) y los eosinófilos, estos son algunos usos actuales de las citoquinas en diferentes enfermedades(11).

#### 4.1.2 Clasificación de las Citoquinas.

Se clasifican las citoquinas según su función fisiológica en la respuesta inmune en:

- Citoquinas que median, regulan la inmunidad innata y la inflamación, también, llamadas citoquinas proinflamatorias, aquí encontramos a:

\*Interferón (INF), es un factor celular inducible, que interfiere con la capacidad de un número variable de virus, poseen propiedades inmunomoduladoras y

antiproliferativas, se dividen en: - Alfa ( $\alpha$ ), este inhibe la replicación viral, reduce la formación de fibroblastos, monocitos y linfocito B (LB), inhibe el crecimiento de células tumorales, aumenta la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase uno (CMH-I) que presentan antígenos tumorales, produce apoptosis en células tumorales, inhibe la angiogenesis, potencia la actividad de monocito, macrófago y células NK. \*Beta ( $\beta$ ), modula la expresión de CMH, aumenta la capacidad lítica de las células NK, efecto antiproliferativo tumoral. \*Gama ( $\gamma$ ), es activador de macrófagos, tiene funciones especiales en la respuesta innata y en la adaptativa (15-17).

\*Factor de necrosis tumoral Gama (FNT- $\gamma$ ), es una proteína no glicosilada, la principal fuente de producción son los macrófagos, también se producen en las células NK, neutrofilos, mastocitos, astrocitos, microglía, fibroblastos, células de musculo liso y linfocitos T CD4, la principal función es reclutar neutrofilos y monocitos en los focos de infección, para erradicar microorganismos, estimula la producción de IL 1 y 6, aumenta la capacidad antimicrobiana de los leucocitos, estimula la angiogenesis, actúa como coestimulador de los Linfocitos T, tiene acción protectora antiviral, aumenta la expresión CMH-I y II, promueve la proliferación de la astrogliá y microglía, en infecciones severas tiene acciones sistémicas, aumenta la síntesis de células en fase aguda, su producción prolongada produce caquexia, en asociación con IL- 1 puede producir alteración endotelial que desencadene coagulopatias, en alteraciones metabólicas severas produce hipoglicemia. Actualmente se utilizan en terapias oncológicas, en artritis reumatoidea, para el tratamiento de choque séptico (15-17).

\*Interleuquina 1 (IL-1), Existen dos formas distintas la alfa y la beta, la acción de los dos tipos es similar, algunas de sus acciones, se realizan indirectamente por la inducción de la síntesis de otras moléculas como la hormona adrenocorticotropa (ACTH), prostaglandina E2, factor plaquetario 4, IL-6 y 8, pero, la principal función es la estimulación de los linfocitos T ayudadores, en los cuales induce la secreción de la IL-2 y la expresión de su receptor (15-17).

\*Interleuquina 6 (IL-6), hay aumento de sus receptores en presencia de infección, pero no por esto, sino como respuesta al aumento de IL-1 y FNT, sus receptores se encuentran en los linfocitos T y B, en los hepatocitos aumenta la síntesis de varias proteínas plasmáticas y es el principal factor de crecimiento de los linfocitos B activados, también, es coestimulador de las células T, los timocitos y cofactor de otras citoquinas (15-17).

\* Interleuquina 12 (IL-12), es una citoquina importante en la respuesta inmune innata y un inductor esencial en la inmunidad celular adaptativa, estimula la producción INF ( $\gamma$ ), induce la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia Th1, induce la síntesis IL-2 y FNT, aumenta la acción citolítica de las células NK, aumenta la acción de múltiples factores de crecimiento de colonias (15-17).

\*Interleuquina 10 (IL-10), es un inhibidor de los macrófagos activados, interviene en el control homeostático de las reacciones de inmunidad innata y celular, inhibe la síntesis de INF  $\gamma$ , IL-2, FNT, la expresión de monocitos, coestimula la producción de mastocitos y linfocitos B en cultivo, induce la secreción de inmonoglobulinas (15-17).

\* Interleuquina 17 (IL-17), es producida por los linfocitos T CD4+, potencia la expresión de la molécula de adhesión intracelular uno en fibroblastos humanos, estimula las células epiteliales, endoteliales, es un mediador de la angiogenesis, se ha observado que participa en la fisiopatología de enfermedades inflamatorias como artritis (15-17).

- Citoquinas que median y regulan la inmunidad adaptativa, las cuales son:

\*Interleuquina 2 (IL-2), es responsable de la expansión clonal de los linfocitos T, su expresión depende de la activación completa de los linfocitos T CD4+, su acción es selectiva dependiendo de los receptores de alta afinidad en los linfocitos, causa proliferación de los linfocitos T, estimula la proliferación, estimulación de las células NK y linfocitos TCD8+, promueve la apoptosis en linfocitos T (15-17).

\*Interleuquina 4 (IL-4), es importante para la producción de anticuerpos de IgE para el desarrollo de linfocitos TCD4+ del patrón Th2, antagoniza los efectos de activación de los macrófagos causado por el INF, promueve la diferenciación y activación de los linfocitos B activadas, estimula la expresión molécula CMH-II (15-17).

\* Interleuquina 5 (IL-5), promueve la producción de los linfocitos Th2 y los mastocitos, estimula el crecimiento y diferenciación de los eosinofilos, la estimulación de la proliferación de los linfocitos B, promueve a partir de los timocitos la proliferación de linfocitos T(15-17).

\*Interferon gama (INF- $\gamma$ ), inhibe la proliferación de varios tipo celulares (15-17).

#### 4.2 ANTECEDENTES DE INVESTIGACION EN “ECHINACEA”

La “*Echinacea*”, es uno de los medicamentos fitoterapéuticos tradicionales, mas utilizados en América. Existen tres especies predominantes de “*Echinacea: angustifolia, purpurea y pallida*” (4).

Los principales metabolitos secundarios identificados en diferentes partes de la planta incluyen alcaloides, alcanidas, polisacáridos, poliactenos, flavonoides, fenilpropanoides libres, glicosilados y aceites esenciales. Las 2 especies de “*Echinacea*” más cultivadas mundialmente son “*Echinacea purpurea*” en un 80% y “*Echinacea angustifolia*” en un 20% (5).

Los herbolarios utilizaban “*Echinacea*” para varias enfermedades, desde alopecia hasta cáncer, su aplicación moderna es sobre todo para el apoyo inmunológico. Hoy en día, es posiblemente el más reconocido suplemento herbario para la prevención y tratamiento de los resfriados y la gripe (4-5).

Las diferentes especies de “*Echinacea*” demuestran propiedades inmunomoduladora, parecen activar la inmunidad celular, humoral y el sistema de complemento, polisacáridos de la “*Echinacea*”, han demostrado “*in vitro*”, estimular preferentemente el sistema mononuclear y estimular la liberación de citoquinas como: IL-1, del mismo modo, los estudios “*in vitro*” en galactanos de “*Echinacea*”, han mostrado que inducen la liberación del FNT- $\alpha$  en los macrófagos, en otro estudio, las glicoproteínas aisladas de la “*Echinacea pallida*” mostraron una marcada respuesta inmunomoduladora, estimulando la producción de inmunoglobulinas como la IgM y proliferación de los linfocitos en ratones. Un estudio aleatorizado, doble ciego, observó 48 adultos participantes, del sexo femenino, durante un período de cuatro semanas para determinar la actividad inmunológica con varias preparaciones de “*Echinacea*”, frente a placebo, en los diversos preparados utilizados en el estudio, se encontró un incremento en la propéidina, una proteína en el suero utilizado como un marcador para evaluar la respuesta inmunológica, este incremento fue del 21 por ciento frente a placebo en los participantes que tomaron una combinación de extracto de “*Echinacea purpurea y angustifolia*”. Los estudios clínicos han mostrado resultados mixtos en relación con “*Echinacea*”, efecto sobre la reducción y la duración de síntomas asociados con un resfriado común, influenza y otras infecciones respiratorias agudas (11).

También, presenta actividad antiinflamatoria, esta actividad se debe, a la producción de prostaglandinas E2, que es un derivado de la ciclooxigenasa uno y dos (COX- I-II), siendo estos clave en la fase inicial de la inflamación (9).

#### 4.3 HOMEOPATÍA

La medicina homeopática es un método terapéutico que apareció en Europa a finales del siglo XVIII, etimológicamente viene de las raíces griegas *homeois* que equivale a semejante y *pathos* que equivale a padecimiento o enfermedad, esta es la base del manejo en homeopatía (1).

La medicina homeopática, es un sistema medico complejo, se basa en la integralidad, esto se ve reflejado en el paradigma de la complejidad, este paradigma esta sustentado en: la teoría de los sistemas, este, resalta el carácter integrado de los sistemas biológicos que muestra la relación que tiene las diferentes partes de un todo o unidad, la sinergia que explica, el todo es la suma de las diferentes partes y la recursividad que explica, que un sistema a su vez, esta compuesto por otro sistema, lo que nos da como resultado la integralidad del ser, pilar fundamental de la homeopatía, esta teoría muestra al ser como un todo compuesto de diferentes partes (2,18,19). Como todo sistema complejo cuenta con 3 disciplinas que son la parte doctrinal, la semiología y el método terapéutico (1).las cuales se explicaran a continuación.

En la parte doctrinal se encuentran sus leyes las cuales son:

1. Vitalismo o Energía vital: La fuerza vital anima al cuerpo material lo gobierna con poder ilimitado, por medio de ella se realizan todas las funciones del cuerpo, es la encargada de dar la armonía a todas las partes del organismo, es inmaterial y soberana, su alteración o perturbación, provocan un estado anormal, esta alteración solo puede ser de índole inmaterial como lo es la fuerza vital, esta perturbación conlleva a que el organismo a presentar síntomas morbosos, estos dan a conocer la enfermedad al observador, para que este a su vez pueda escoger el remedio adecuado que ayude a la fuerza vital a recuperar su armonía para así provocar de nuevo un estado de salud (1,3).

2. Principio de semejanza: En el cual se plantea que toda sustancia que es capaz de provocar enfermedad en un individuo sano, a su vez, es capaz de curar enfermedades cuyos síntomas y signos sean similares a los que produce en el individuo sano, la fuerza de los síntomas del medicamento son mayores a los de la enfermedad, esto provoca en cada caso individual una curación rápida, segura y radical, entonces, se observa que la energía vital alterada por

una enfermedad natural, al ser embargada, por la enfermedad artificial del medicamento teniendo esta mas fuerza que la natural, provoca que la enfermedad cese y desaparezca, estos síntomas artificiales se agotan dejando al paciente libre de enfermedad (1,3)

3. Experimentación pura o Patogénesis: Esta es la manera en que se puede averiguar los síntomas morbosos provocados por medicamentos en sujetos sanos, es un camino seguro y natural de poder descubrir que cambios, síntomas y signos individuales producen los diversos medicamentos en la salud física y mental. Para obtener la totalidad de los elementos morbosos que produce un medicamento se debe realizar observaciones en numerosas personas de ambos sexos, con condiciones adecuadas y de constituciones diferentes, solo se puede saber si los hallazgos son verdaderos si aparecen casi siempre los mismos síntomas en casi todos los sujetos. La dosis utilizada para esta experimentación es la trigésima potencia o 30 CH (3,20).

4. La Dosis infinitesimal: Los medicamentos homeopáticos deben ser diluidos y dinamizados, lo cual atenúa los efectos tóxicos del medicamento y potencia efectos curativos, así se tiene que en los medicamentos homeopáticos no se encuentra la sustancia que le dio origen, por estar generalmente por encima de la cuarta dilución centesimal hahnemaniana (CH), Hahnemann desarrolló técnicas para controlar la concentración, de las sustancias para crear los remedios homeopáticos. Primero, tomó la sustancia y la conservó en un solvente, normalmente alcohol, las sustancias que usó fueron plantas, animales y minerales, lo que se conoce como tintura madre, luego, tomó una gota de la disolución y le añadió 99 gotas de alcohol puro, mezcló el líquido precipitando el contenedor sobre una superficie dura, lo que sería la succusión o dinamización, se cree que la dinamización es esencial para crear un remedio efectivo. El primer paso crea un remedio con una disolución de una parte en 10 o 100. Esta disolución será anotada por CH de centesimal, la disolución continúa, siempre añadiendo una parte de la tintura a 99 partes de alcohol y haciendo dinamización a cada paso. Dicho proceso realizado seis veces conlleva a un remedio 6 CH y así sucesivamente (1,21).

5. Individualidad morbosa y medicamentosa: Cada individuo tiene una manera individual de enfermarse, así mismo, el medicamento homeopático elegido como tal, reúne todos los síntomas y signos clínicos que manifiesta un individuo, siendo capaz de curar a este al incluir la totalidad sintomática (1).

6 Ley de la curación: Esta indica, la manera en que se evoluciona de la enfermedad a la curación, entonces, la mejoría se presenta de manera centrifuga de adentro hacia afuera, de arriba hacia abajo, aliviando a los órganos mas importantes primero y hay una curación de síntomas de la



enfermedad en sentido inverso, esto quiere decir, que los últimos síntomas en desaparecer serán los primeros que aparecieron (1,20-21).

7 Ley de acción y reacción, es el efecto que ejerce el medicamento cuando se administra a un ser vivo, describe la acción y reacción del ser vivo al medicamento. Todo medicamento que obra sobre la vitalidad provoca una desarmonía en la fuerza vital y produce cierta alteración en la salud por un periodo mas o menos largo esta es llamada la acción primaria, a esta acción la energía vital pone oposición esta es una acción automática de conservación y esta es la acción o reacción secundaria al medicamento (1,3)

8. Miasmas, todo ser humano esta propenso a enfermarse de cierta forma, es el terreno que tiene el paciente que lo predispone a la enfermedad (1).

La semiología es la manera de interpretar los signos y síntomas morbosos que expresa la energía vital en su estado anormal, para esto el medico debe deshacerse de cualquier preconcepto observar atentamente y tratar de ser fiel a lo real, debe permitir que el paciente exprese toda su sintomatología sin interrumpirlo, preguntarle acerca de su régimen de vida, para poder así tratar obtener los signos y síntomas morbosos dignos de curar, que la energía vital quiere dar a conocer como enfermedad (1,3).

El método terapéutico, al obtener los signos y síntomas morbosos dignos de curar, se halla la totalidad sintomática por medio de la cual la enfermedad indica el medicamento para su alivio (3).

#### 4.4 PATOGENESIA O EXPERIMENTACIÓN PURA DE “*ECHINACEA ANGUSTIFOLIA*”

Como se había explicado anteriormente, la patogenesia de un medicamento, es el resultado de la experimentación de este en una persona, anotando cuidadosamente los síntomas encontrados, en el caso de la “*Echinacea angustifolia* estos son los síntomas mas representativos hallados.

\*Síntomas mental: Aturdimiento en la cabeza, con irritabilidad, confusión, no puede estudiar ni pensar, ni lo desea, está somnoliento, no puede leer, bostezo. Lento al hablar y contestar, se irrita si lo corrigen y no tolera que lo contradigan, depresión mental en la tarde.

\*Síntomas generales: su indicación fundamental, manejo de enfermedades infecciosas y febriles, es en septicemias toxemias, con estados adinámicos. Mordeduras de serpientes, picaduras de insectos y sus efectos.

Agrava: después de comer, al anochecer, por esfuerzos físicos y mentales, por exposición al aire frío. Mejora: acostado y en reposo, inclinado hacia adelante.

\*Síntomas Particulares: Vértigo al mover la cabeza, cefalea sorda que empeora al anochecer, con sensación de plenitud o cerebro demasiado grande, peor a cada latido, cefalea frontal sobre los ojos a lado izquierdo, mejora al aire libre. Cefalea en el vértex que mejora con el reposo. Cefalea en las sienes, pulsátil, que mejora con la presión y el reposo, en región occipital siente la cabeza muy grande. Dolor agudo profundo en el cerebro. Cefalea con oleadas periódicas de calor a la cabeza, cara y cuello, con vértigo y postración. Los ojos duelen al leer o mirar un objeto cercano, con lágrimas, mejora al cerrarlos, siente como somnolencia en los ojos, sin sueño, ojos brillantes, lagrimeo por aire frío. Obstrucción nasal que no mejora sonándose, narinas dolorosas, descarga mucosa del lado derecho de la nariz, con dolorimiento como en carne viva y epistaxis, secreción nasal fétida, catarro postnatal con ulceración y fetidez, salen falsas membranas de la nariz, estornudos con cefalea frontal. Laringe irritada, voz ronca, se la aclara constantemente y expulsa mucosidades. Erupciones en la frente y mejillas, cosquilleo o picoteo en los labios. Neuralgias en el maxilar superior e inferior. Grietas en labios y comisuras labiales. Odontalgias del lado derecho. Lengua blanca de mañana con bordes rojos o marrón, con leve ardor y cosquilleo. Mucosidades adherentes, blancas, espumosas. Ardor de lengua con sialorrea. Boca seca en su parte posterior, encías sangrantes, aftas, mal sabor en boca en la mañana, sabor metálico, a pimienta. Garganta dolorida al lado izquierdo, con mucosidades y Sensación de tenerla en carne viva, cosquilleo o picoteo u hormigueo y ardor en la garganta. Angina ulcerosa o gangrenosa, amígdalas lívidas, púrpuras o negruzcas, recubiertas de una falsa membrana grisácea que se extiende al orofaringe y laringe. Difteria con expresión agónica, fiebre muy alta y pulso filiforme. Anorexia. Deseo de agua fría. Náuseas que le impiden comer que mejora acostado. Después de comer, se siente lleno de gases con eructos, sensación de algo duro y grande en el estomago, eructos ácidos, ardor en estomago, gastralgias que baja a los intestinos, seguidos de diarrea, dolor en el hipocondrio derecho, sensación de plenitud en el abdomen, dolores umbilicales que mejoran doblándose, dolores agudos, cortantes, en el vientre, que aparecen y desaparecen bruscamente, dolor en la fosa ilíaca izquierda. Apendicitis. Peritonitis. Dolores constrictivos en el vientre, seguidos por flatos ofensivos o una deposición floja amarillenta asociada a gran agotamiento, sangra después de defecar. Micciones frecuentes, a veces involuntarias, calor al pasar la orina, dolor y ardor al orinar, orina pálida, copiosa, oscura, dolor en el periné lo siente como estirado. Testículos doloridos y retraídos. Fiebre o septicemia puerperal, con supresión de descargas y timpanismo doloroso. Flujo mucoso al anochecer, excorianté, ofensivo. Dolor profundo en la fosa ilíaca

derecha. Dolor como por un cuerpo extraño en el tórax y detrás del esternón, dolor agudo quemante retro esternal, dolor en los músculos pectorales. Sensación de plenitud en la parte superior del tórax. Dolor en el pulmón derecho, leves dolores o puntadas precordiales, sensación de latidos rápidos en el corazón. Dolor en la parte superior de la espalda, en región lumbar y sacro que empeora al agacharse. Debilidad en los miembros, dolor en el hombro izquierdo que mejora con el reposo y el calor, dolor agudo en el brazo izquierdo, que baja a los dedos, con sensación de falta de fuerzas, dolor agudo en el codo izquierdo, manos frías, dolor en las muñecas y en el pulgar derecho. Dolor en el muslo derecho, pierna derecha y cadera izquierda, pies fríos. Sudores en la parte superior del cuerpo. Intenso prurito y ardor en la piel del cuello. Pápulas rojas que pican, piel seca, forúnculos, abscesos, erisipelas, las afecciones cutáneas se presenta con un estado general grave (22,23).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 PREPARACIÓN DE LA FORMULACIÓN HOMEOPÁTICA DE “*ECHINACEA ANGUSTIFOLIA*”

La “*Echinacea angustifolia*” se prepara de acuerdo a la farmacopea homeopática Alemana Versión 2000 (24). Método 3ª: tintura madre y diluciones líquidas, la primera dilución decimal (D1) se hace a partir del 3 partes (volúmenes) de Tintura Madre y 7 partes (volúmenes) de alcohol 62% (p/p). La segunda dilución decimal (D2) se hace a partir de 1 parte de la primera dilución decimal y 9 partes de alcohol 62% (p/p), las diluciones siguientes se producen subsecuentemente, se emplea alcohol al 43% para elaborar las diluciones desde la cuarta dilución (D4) en adelante.

Esta preparación fue realizada en el Laboratorio Homeopático Alemán Ltda., quien certifica el análisis del producto. Con certificación ISO 9001:2008

### 5.2 OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Luego de obtener el obligatorio consentimiento informado por parte de los participantes del estudio (Anexo 1). Se eligieron a 11 individuos sanos en edades entre los 20 y 40 años de edad según criterios de inclusión mencionados mas adelante , posterior a la obtención de la muestra de sangre periférica, se obtuvieron células mononucleares, mediante gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque por centrifugación a 400g por 20 min a temperatura ambiente. Después de esto, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI Invitrogen® a 300g por 10 min y la densidad celular se calculó por conteo en cámara de Neubauer, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Numero de células} = X/4 \text{ (fd) (V) (D)}$$

X/4= promedio de células en 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer

fd= factor de dilución Azul Tripán/suspensión celular

V = 10.000 volumen de la cámara de Neubauer

D = volumen en el que se encuentra la suspensión celular.

### 5.2.1. Evaluación del efecto de “*Echinacea angustifolia*” sobre la viabilidad celular de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos.

Para poder determinar el efecto de la “*Echinacea angustifolia*” sobre la viabilidad celular, las células mononucleares fueron utilizadas inmediatamente después de ser aisladas y se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo celular RPMI suplementado con 10% de suero autólogo, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina/estreptomicina.

La evaluación de la toxicidad de “*Echinacea angustifolia*” se realizó en cajas de cultivo de 96 pozos en los cuales se sembraron 1x10<sup>5</sup> células/pozo en un volumen total de 150µl de medio RPMI suplementado. Las células se sembraron por triplicado, para cada dilución y dosis de compuesto, y se utilizaron 6 pozos sin adición del compuesto “pozos control” para cada dilución y dosis. El tratamiento con “*Echinacea angustifolia*” se llevó a cabo adicionando las dosis de 2, 4, 6, 8, 10,12 y 14 µl, de la dilución 30 CH.

Se evaluó la viabilidad celular a las 48 y 72 horas de tratamiento por el método colorimétrico de MTT. Para esto, una vez cumplido el tiempo, el medio de cultivo fue retirado de cada pozo y se adicionó 100µl de la solución de MTT preparada en medio de cultivo RPMI sin suero y las células fueron incubadas por 4 horas a 37°C. Cumplido este tiempo de incubación se retiró el MTT de los pozos, y los cristales de formazan generados por las células vivas fueron disueltos adicionando a los pozos 100µl de dimetilsulfóxido DMSO e incubación en oscuridad por 15 minutos. Se obtuvieron lecturas de absorbancia a 595nm en un lector de placas Humareader utilizando como blanco 3 pozos con el disolvente DMSO.

Los resultados de viabilidad se expresaron como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia de las células tratadas}}{\text{Absorbancia de las células control}} \times 100$$

La curva dosis respuesta se calculó teniendo en cuenta el rango de diluciones y dosis utilizadas y el porcentaje de reducción o aumento del crecimiento celular correspondiente. A partir de ello se determinaron las diluciones que produjeron la reducción de la viabilidad celular, y se escogió la dosis y tiempo para el análisis de citoquinas por Elisa.

### 5.2.2. Evaluación de los niveles de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica tratadas con “*Echinacea angustifolia*”.

Para evaluar los niveles citoquinas en células mononucleares de sangre periférica tratadas con “*Echinacea angustifolia*” homeopatizada, se utilizaron once voluntarios sanos que cumplieron con los criterios de inclusión:

- Personas que no presentaran enfermedades virales, bacterianas o inmunosuprimidos.
- Personas que no estuvieran recibiendo algún tipo de tratamiento alopático u homeopático.
- Personas que tuvieran en su muestra el número de células mononucleares necesarias para el estudio.
- Personas que aprueben el estudio, que luego de leer y entender posibles complicaciones de toma y los requerimientos del estudio, estén de acuerdo firmando el consentimiento informado.

Los voluntarios sanos que cumplieron con los criterios de inclusión antes descritos, se les toma datos personales y la muestra de sangre periférica. A 10 de estas muestras se les expuso al medicamento y una de las onces muestras fue tomada como control a la cual no se expuso a ninguna sustancia.

La cuantificación de los niveles de citoquinas se determinaron sobre las células mononucleares tratadas con “*Echinacea angustifolia*” homeopátizada con la dosis seleccionada y la potencia escogida la 30 CH previamente succusionada, mediante el ensayo “Cytokine Human Panel” Invitrogen en el equipo Luminex 200. Donde se eligieron de este kit la medición de la IL 1 $\beta$ , IL 6, IL 8, IL 10, FNT ya que son las citoquinas proinflamatorias más medidas en los estudios realizados con “*Echinacea*” en presentación fitoterapéutica. Para esto se siguieron las especificaciones del fabricante (Anexo 2).

### 5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para cada citoquina analizada en cada uno de los pacientes. Se realizó análisis de varianza *Anova* para hallar diferencias entre las citoquinas analizadas y sus respectivos controles seguidos por una test de Bonferroni.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1 VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE INDIVIDUOS SANOS AL APLICAR “*ECHINACEA ANGUSTIFOLIA*” HOMEOPATIZADA A LA 30 CH.

La viabilidad “*Echinacea angustifolia*” se llevó a cabo adicionando las dosis de 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14  $\mu\text{l}$  de la preparación a potencia 30 CH previamente succionada, dando como resultado en las diferentes dosis un efecto proliferativo, que alcanza en su dosis 14  $\mu\text{l}$  una proliferación del 40.9 % con referencia al control (Tabla No 1) por lo cual se decidió realizar el experimento a esta dosis, ya que fue la que provoco mayor proliferación celular. Estos resultados encontrados en la medición de la viabilidad celular demuestra que la “*Echinacea angustifolia*” a la 30 CH provoca en las células mononucleares un efecto mitogénico, ya que conlleva a proliferación de las mismas (Figura No1). Estos resultados, también, dejan ver que el medicamento a lo largo de las diferentes dosis aplicadas a la células mononucleares no provoco ningún tipo de toxicidad, lo que da ha entender que la “*Echinacea angustifolia*” a la 30 CH no tiene efectos tóxicos sobre las células.

Otro conclusión del resultado de la viabilidad, es que sustancias disueltos mas allá del numero de Avogadro si presenta en sus compuestos parte del medicamento, ya que en la viabilidad si se observa una diferencia en el crecimiento celular entre las células expuestas a la “*Echinacea angustifolia*” a la 30 CH previamente succionada y el control, lo que ayuda a entender y respalda la ley de la dosis infinitesimal, porque si no fuese así, los resultados deberían ser iguales o muy similares.

### 6.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS CITOQUINAS MEDIDAS AL APLICAR “*ECHINACEA ANGUSTIFOLIA*” HOMEOPATIZADA A LA 30 CH VS CONTROL.

La cuantificación de los niveles de las citoquinas IL 1 $\beta$ , IL6, IL 8, IL 10, FNT se determinaron sobre las células mononucleares tratadas con “*Echinacea angustifolia*” homeopátizada a 30 CH previamente succusionada vs el control que no presenta exposición a ninguna sustancia, esto fue medido, por medio el ensayo “Cytokine Human Panel” Invitrogen en el equipo Luminex 200. Dando como resultado en todas las interleuquinas expuestas a medicamento vs control, diferencias no significativas ( $P>0.05$ ) como lo muestra la Figura No 2. En cuanto al FNT presento reportes por encima del reporte de curva de

calibración del equipo Luminex por lo cual no pudo ser tomado en cuenta esto se muestra en la Figura No 3.

### 6.3 RESPUESTA INDIVIDUAL DE LAS CITOQUINAS EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE CADA PACIENTE AL APLICAR *ECHINACEA ANGUSTIFOLIA* HOMEOPATIZADA A LA 30 CH VS CONTROL.

En la cuantificación de los niveles de las citoquinas IL 1 $\beta$ , IL6, IL 8, IL 10, FNT expuestas a la "*Echinacea angustifolia*" homeopátizada a 30 CH previamente succusionada vs el control, se evaluó, dentro del estudio, la posibilidad de, diferentes respuestas de las citoquinas, de cada uno de los 10 pacientes evaluados vs el paciente control, para investigar si hay respuestas individuales en cada muestra de células mononucleares aislada de la sangre periférica, en la figura No 4 y en las tablas No 2 al 5, se puede ver que la respuesta en los diferentes pacientes, incluyendo al control es muy similar lo que da diferencias no significativas ( $P>0.05$ ), exceptuando el paciente numero 3 y en menor proporción el paciente numero 10 donde se observa una respuesta elevada de la IL6 con respecto al control. Pero en general, no hubo una diferencia significativa e individualizadora entre pacientes y tampoco, comparándose con el control.



## 7. DISCUSION

La inmunología, se ha convertido en un puente, entre, la medicina homeopática y la alopática, ya que, en la inmunología, es mas, fácil aplicar la leyes de la homeopatía, tal como es, el caso de la ley de la similitud y la de la dosis infinitesimal, es por esto, que el campo de la inmunología ha sido un buen terreno para el estudio de la homeopatía. En el campo científico, se encuentran, diversos estudios, que evalúan, la respuesta de células inmunológicas de la sangre frente a diferentes medicamentos homeopáticos (23-26). Una, de las células estudiadas son, las mononucleares, debido a, que estas, se prestan para realizar estudios “invitro”, para evaluar las respuestas de las células inflamatorias, por esto, se escogió este tipo de células para este estudio. En los objetivos, de esta investigación, se tenia diferentes expectativas, una de estas era evaluar si, la “*Echinacea angustifolia*” homeopatizada a la 30 CH, presentaba un efecto inmunomodulador en las citoquinas proinflamatoria y otro, si este efecto podría ser comparable o similar al presentado en estudios realizados con “*Echinacea*” en presentación fitoterapeutica.

Se observo, en la viabilidad, realizada a las células mononucleares, frente a la aplicación del medicamento homeopático a diferentes dosis, una proliferación de hasta 40 % con referencia al control, lo que indicaría que la “*Echinacea angustifolia*” a la 30 CH presenta una respuesta mitogénica, al promover una proliferación a nivel de las células mononucleares. Lo que confirmaría que su uso en cuadros infecciosos, esta indicado, como se refiere en diferentes materias medicas (22,23). Este resultado comprueba, que si hay, un efecto modulador sobre el sistema inmune, específicamente sobre las células mononucleares y que este puede, equipararse a lo visto con el medicamento en presentación fitoterapeutica.

En el estudio con el kit de citoquinas, medidas por medio del equipo de Luminex, se encontró una diferencia no significativa, entre las citoquinas expuestas al medicamento homeopático y el control, esto se puede deber a varios factores, el primero puede ser la potencia a la que se dio. Aunque, se eligió la potencia 30 CH para la realización de este estudio, porque, fue la que utilizo Hahnemann para efectuar la patogenesia, tal vez, a esta potencia las citoquinas no presentan activación, pero, como se había comentado anteriormente, en la literatura no hay evidencia de estudios similares con “*Echinacea*” en presentación homeopática, por lo cual, no se pueda realizar una comparación de este resultado, pero, se puede llegar a la hipótesis, de que tal vez, a potencias mas elevadas, de hecho al utilizar otras escalas, como la

milesimal, es posible que se encuentren resultados significativos, esto da pie a nuevas investigaciones en el futuro que puedan llegar a aclarar esta hipótesis.

Otra opción, puede ser, que los mecanismos inmunomoduladores de la “*Echinacea*” Homeopatizada no estén asociados a estas citoquinas y por lo cual estas no sean sensibles a este medicamento. En un estudio realizado con el cadmio en presentación homeopática a diluciones 15 y 20 CH expuesto sobre células cancerígenas y sobre linfocitos primarios se encontraron una respuesta de los linfocitos T, mientras ninguna respuesta sobre las células cancerígenas, esto se interpreto como una diferente sensibilidad frente al medicamento (29), esto podría ser lo que sucedió en el estudio actual, que no hay una suficiente sensibilidad de las citoquinas expuestas a la “*Echinacea*” homeopatizada, esta podría ser otra hipótesis que explique los resultados de esta investigación.

Por otro lado, se podría llegar a creer que el tipo de técnica utilizado para este estudio no es el mas indicado, en la literatura se ha encontrado variedad de técnicas utilizadas, todas con diferentes resultados, actualmente, no se ha llegado a determinar, cual es, el mejor sistema de prueba, para la realización de los experimentos en homeopatía (30), como tal, no habría un fundamento claro para confirmar o descartar esta posible hipótesis, de ahí, la importancia que hay hoy en día, de definir métodos únicos para realización de los estudios experimentales en homeopatía, para que así, estos mismos, puedan tener la posibilidad de ser repetidos, hallando la misma respuesta, que es uno de los grandes problemas que se tienen actualmente, para dar confiabilidad a los resultados encontrados en la investigación homeopática (31).

Otro resultado que se evaluó, fue la respuesta de las células mononucleares de cada paciente, lo que ayudaría a evaluar la ley de la individualidad, al observar las graficas se observa que la mayoría de respuestas son similares, pero, en 2 de los 10 pacientes, se observo una diferencia, en el paciente 3 y 10, se observo una respuesta de la IL 6 al medicamento, esto puede ser interpretado como una respuesta individual del paciente frente al medicamento, aunque no es significativo, es posible que en estudios posteriores con potencias mas elevadas, estas, respuestas individuales al medicamento sean mas evidentes y desde el punto de vista molecular se pueda corroborar esta ley de la homeopatía.

En la viabilidad de las células mononucleares frente a la “*Echinacea angustifolia*”, se observo como se había dicho anteriormente una proliferación de la células, lo que no solo demuestra que, si ejerce un efecto mitogénico y modulador, sino, que corrobora que a pesar de que la potencia que utilizamos esta mas allá del numero de Avogadro que se sobrepasa luego de la potencia

12 CH, hay un efecto diferente al control, lo que demuestra desde el punto de vista molecular, que si hay medicamento a pesar de la dilución de este, lo que sustenta la veracidad de la ley de la dosis infinitesimal, esta ha sido corroborada en otros estudios, entre estos, esta el de *Secale cornutum* a la 30 CH, utilizado para el manejo de cáncer de piel, donde, quieren evaluar la respuesta histológica del papiloma DMBA inducida en ratones, al exponerse a un medicamento que a pesar de que se supera el número de Avogadro y que supuestamente, ya no se encuentra ninguna partícula del medicamento original, encontrándose una reducción en la incidencia del papiloma(32). En la revisión sistemática de modelos animales y altas diluciones, realizada por Bonamin y Endler, donde se escogieron 31 artículos, da como una de las conclusiones, la efectividad de los medicamentos altamente diluidos (33).

Otro punto importante que aporta la viabilidad es que dejan ver que el medicamento a lo largo de las diferentes dosis aplicadas a las células mononucleares no provocó ningún tipo de toxicidad.

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados del estudio en cuanto a lo observado en la viabilidad son positivos, porque muestran que si hay un efecto mitogénico de la "*Echinacea*" homeopatizada sobre las células mononucleares, lo que confirma que presenta una respuesta moduladora sobre el sistema inmune, lo que demuestra que su uso en infecciones es adecuado.

Desde el punto de vista de doctrina homeopática, corrobora la ley de dosis infinitesimal. También, muestra que la "*Echinacea*" homeopatizada no presenta toxicidad.

Dentro de la discusión, se deja planteadas diferentes hipótesis, que dejan la puerta abierta, para la realización de nuevos proyectos a base de este, para valorara las diferentes inquietudes e hipótesis, que se presentaron en los resultados de este estudio y siga aportando nuevos conocimientos desde la biología molecular a la medicina homeopática del siglo veintiuno.

Este tipo de estudio, promueve y estimula la investigación en homeopatía, esto es muy importante, para que la homeopatía como ciencia medica se continúe actualizando y se corrobore desde el punto científico su viabilidad y eficacia, cuestionada hoy en día por la medicina alopática.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Barrios J. Bayona M. Correa F. Cubillos C. González F. Guerrero M. Gutiérrez S. López L. Martillett A. Quiroz T. Ramírez A. Morales H. Rojas A. Riveros C. Riveros N. Vargas L. Vega A. **DOCTRINA HOMEOPÁTICA**. Ed. Fundación Instituto Homeopatía Luis G Páez 2005 Pág. 12-21
2. Dalcanale Tesser Ch, Luz M. **Racionalidades médicas e integralidade**. Medical rationalities and integrality. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13(1):195-206, 2008.
3. Hahnemann S. **Organon del Arte de curar**. Ed. B.JAIN PUBLISHERS(P) LTDA. 2008.
4. Mishima D, Saíto K, Maruyama H, Inoue M, Yamashita T, Ishida T, Yeunhwa G. **Antioxidant and Immuno-Enhancing Effects of Echinacea purpurea**. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27(7) 1004—1009
5. Loaiza JR, Rodríguez G, Molina J. **Análisis Cuantitativos de los Principales Constituyentes Químicos de Raíces de Echinacea purpurea Y Echinacea angustifolia Producidas en Costa Rica**. *Agronomía Costarricense*. 2004; 28(2): 53-59.
6. Dustin A, Avery S, Yi L, Filippo M, Patricia M, Marian K, David S. **Cytokine- and Interferon-Modulating Properties of Echinacea spp. Root Tinctures Stored at –20°C for 2 Years**. *J Interferon Cytokine Res.* 2007 May; 27(5): 425–436.
7. Rininge J, Kickner S, Chigurupati P, McLean A, Franck Z. **Immunopharmacological activity of Echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells**. *J Leukocyte Biology.* 2000; 68:503-510
8. Kim LS, Waters RF, Burkholder PM. **Immunological activity of larch arabinogalactan and Echinacea: a preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial**. *Altern Med Rev.* 2002 Apr; 7(2):138-49.
9. Birt DF, Widrlechner MP, LaLone CA, Wu L, Bae J, Solco AKS, Kraus GA, Murphy PA, Wurtele ES, Leng Q, Hebert SC, Maury WJ, Price J P. **Echinacea in infection**. *Am J Clin Nutr.* 2008 February; 87(2): 488S-492S.

10. Roxas M, Jurenka J. **Colds and Influenza: A Review of Diagnosis and Conventional, Botanical, and Nutritional Considerations.** *Altern Med Rev.* 2007; 12 (1)
11. Spelman K, Burns JJ, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M. **Modulation of Cytokine Expression by Traditional Medicines: A Review of Herbal Immunomodulators.** *Altern Med Rev.* 2006; 11(2): 128-130
12. Pugh ND, Tamta H, Balachandran P, Wu X, Howell J, Dayan FE, Pasco DS. **The majority of *in vitro* macrophage activation exhibited by extracts of some immune enhancing botanicals is due to bacterial lipoproteins and lipopolysaccharides.** *Int Immunopharmacol.* 2008 July; 8(7): 1023–1032.
13. Barrett B, Brown R, Rakel D. **Placebo Effects and the Common Cold: A Randomized Controlled Trial.** *Ann Fam Med* 2011; 312-322
14. Senchina D., McCann D, Flinn G. ***Echinacea tennesseensis* ethanol tinctures harbor cytokine- and proliferation-enhancing capacities.** *Cytokine.* 2009 May; 46(2): 267–272
15. Rugeles MT, Patiño PJ, Montoya CJ. **INMUNOLOGIA UNA CIENCIA ACTIVA.** 2ª edición. Ed Universidad de Antioquia, 2009: 332-361
16. Nathan C, Ding A. **Nonresolving Inflammation.** *Cell.* 2010 March; 140: 871-882
17. Cano N, Montoya CJ. **Revisión de tema: Las quimioquinas: citoquinas Proinflamatorias y reguladoras del tráfico celular.** *IATREIA.* 2001 march; 14 (1)
18. Boon H, Macpherson H, Fleishman S. **Evaluación de sistemas de salud complejos: Crítica de cuatro enfoques.** *ECAM* 2007; 4(3) 279-285.
- 19 Araujo González R. **Valor epistemológico de la Teoría de la Complejidad para la Medicina.** *Rev Hum Med* [online]. 2008, vol.8, n.1
20. Carrero M V. **Hablemos de homeopatía.** *Rev. Cubana Med Milit* 2005; 34(2).
- 21 Avello L<sup>a</sup>M, Avendaño O C, Mennickent S. **General aspects of homeopathy.** *Rev. Méd. Chile.* 2009 Jan; 137 (1).
22. Jouanny J, Demarque D, Poitevin B. **Farmacología y materia medica homeopatica.** Primera Edición. Ed. BOIRON S.I.H, España 1997. Pag. 184

23. Phatak SR. **Materia Médica de Medicinas Homeopáticas.** Ed.Jain Publisher PVT.LTDA.1994. Pág. 376-380.
24. **German Homoeopathic pharmacopoeia.** Ed. Medpharm Scientific Publishers.2003.
25. Bellavite P, Conforti A, Pontarollo F and Ortolani R. **Immunology and Homeopathy. 1. Historical Background.** eCAM 2005; 2(4)441–452.
26. Bellavite P, Conforti A, Pontarollo F and Ortolani R. **Immunology and Homeopathy. 2. Cells of the Immune System and Inflammation.** eCAM 2006; 3(1)13–24.
27. Lorenz I, Schneider EM, Stolz P, Brack A, Strube J. **Sensitive flow cytometric method to test basophil activation influenced by homeopathic histamine dilutions.** Complementary Therapies in Medicine (2005) 13, 91—100.
28. Fimiani V, Cavallaro A, Ainis O, Bottari C. **Immunomodulatory effect of the homoeopathic drug Engystol-N on some activities of isolated human leukocytes and in whole blood.** Immunopharmacol Immunotoxicol. 2000 Feb; 22(1):103-15.
29. Wälchli Ch, Baumgartner S, and Bastide M. **Effect of Low Doses and High Homeopathic Potencies in Normal and Cancerous Human Lymphocytes: An *In Vitro* Isopathic Study.** THE JOURNAL OF ALTERNATIVE AND COMPLEMENTARY MEDICINE. Volume 12, Number 5, 2006, pp. 421–427.
30. Jäger T, Scherr C, Wolf U, Simon M, Heusser P, and Baumgartner S. **Investigation of Arsenic-Stressed Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Bioassay in Homeopathic Basic Research.** *TheScientificWorldJOURNAL* (2011) 11, 568–583
31. Endler PC, Thieves K, Reich C, Matthiessen P, Bonamin L, Scherr C and Baumgartner S. **Repetitions of fundamental research models for homeopathically prepared dilutions beyond 10-23: a bibliometric study.** Homeopathy (2010) 99, 25–36.

32. Khuda-Bukhsh A, Bhattacharyya S, Paul S, Dutta S, Boujedaini N, and Belon P. **Modulation of Signal Proteins: A Plausible Mechanism to Explain How a Potentized Drug Secale Cor 30C Diluted beyond Avogadro's Limit Combats Skin Papilloma in Mice.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2011, Article ID 286320, 12 pages.

33. Bonamin L and Endler P. **Animal models for studying homeopathy and high dilutions: Conceptual critical review.** Homeopathy (2010) 99, 37–50



## ANEXOS

Anexo No 1. Consentimiento informado.



### **Consentimiento informado**

#### **Fecha:**

Un grupo de investigadores de la Universidad Nacional de Colombia se encuentra desarrollando un proyecto de investigación con el propósito de determinar la acción de medicamentos homeopáticos sobre células mononucleares de humanos.

Para poder efectuar la medición es necesario obtener una muestra de sangre de donantes voluntarios. A partir de dicha muestra se obtendrán células mononucleares que serán expuestas al medicamento homeopático. Una vez se realicen y registren las observaciones no se utilizarán con ningún otro propósito.

La participación en el estudio es voluntaria y usted puede elegir retirarse en cualquier momento. La información recolectada, será archivada garantizando la confidencialidad de la identidad de cada participante, las conclusiones derivadas de la investigación; podrán ser enviadas a una publicación científica o expuestas ante la comunidad médica.

Los riesgos y efectos adversos del procedimiento de punción venosa son: Dolor generalmente mínimo mientras se realiza la punción, hematoma en sitio de punción, venoflebitis, infección en sitio de punción.

Queda constancia de que el voluntario ha entendido lo anteriormente expuesto y acepta participar libre y voluntariamente en el estudio.

Nombre \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_  
CC \_\_\_\_\_ Tel \_\_\_\_\_

## **Anexo No2. Especificaciones del fabricante del kit “Cytokine Human Panel” Invitrogen.**

Especificaciones generales

Marca: Luminex ®

Marcador: GRO- $\alpha$ , eotaxina, MCP-2, MCP-3, RANTES, IP-10, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, MIG, MIP-1 $\alpha$

Sistema: Luminex ®

Especie: Humano

Plataforma: Luminex ®

Bolas Tipo: Poliestireno

Bolas Región: Ver prospecto del producto

Sensibilidad: Ver prospecto del producto

Tamaño del producto: 100 pruebas

Proteínas de la familia: Quimiocinas

Lectura de la enzima: RPE

Método de detección: Fluorescente

Investigación Categoría: inmunología

Tipo de muestra (específico): Suero, plasma,

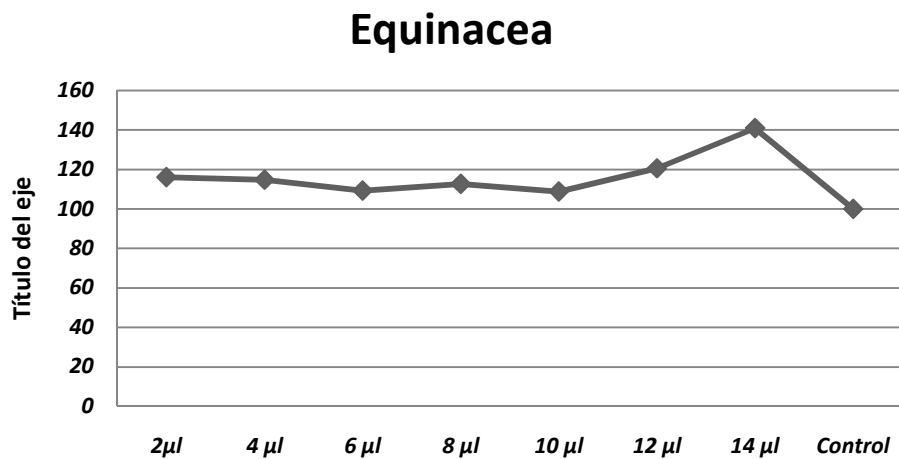
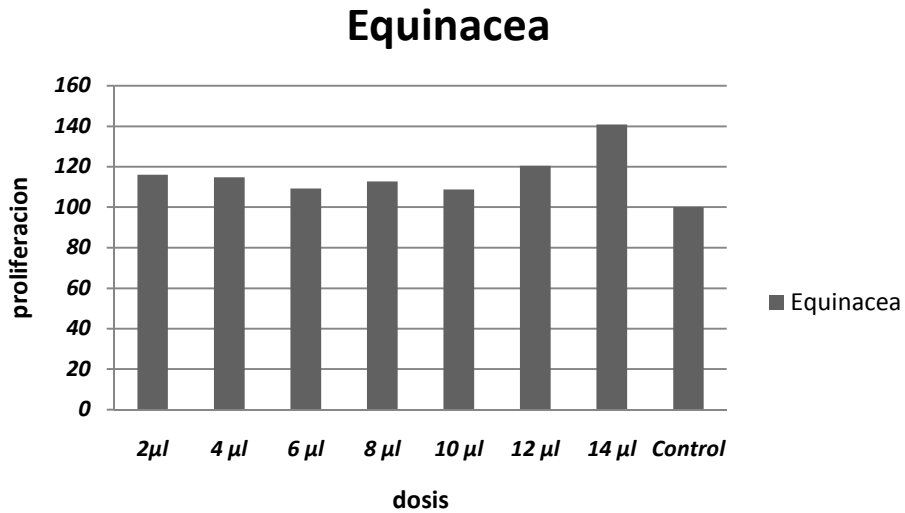
Sobrenadantes de cultivo celular

Contenido y almacenamiento :Premezclado contiene perlas recubiertas de anticuerpos de captura, de serie, el anticuerpo detector premezclado, diluyentes, concentrado de SAV, tampones, la solución de lavado, filtro de placas, el protocolo completo y la hoja de muchos datos técnicos específicos.

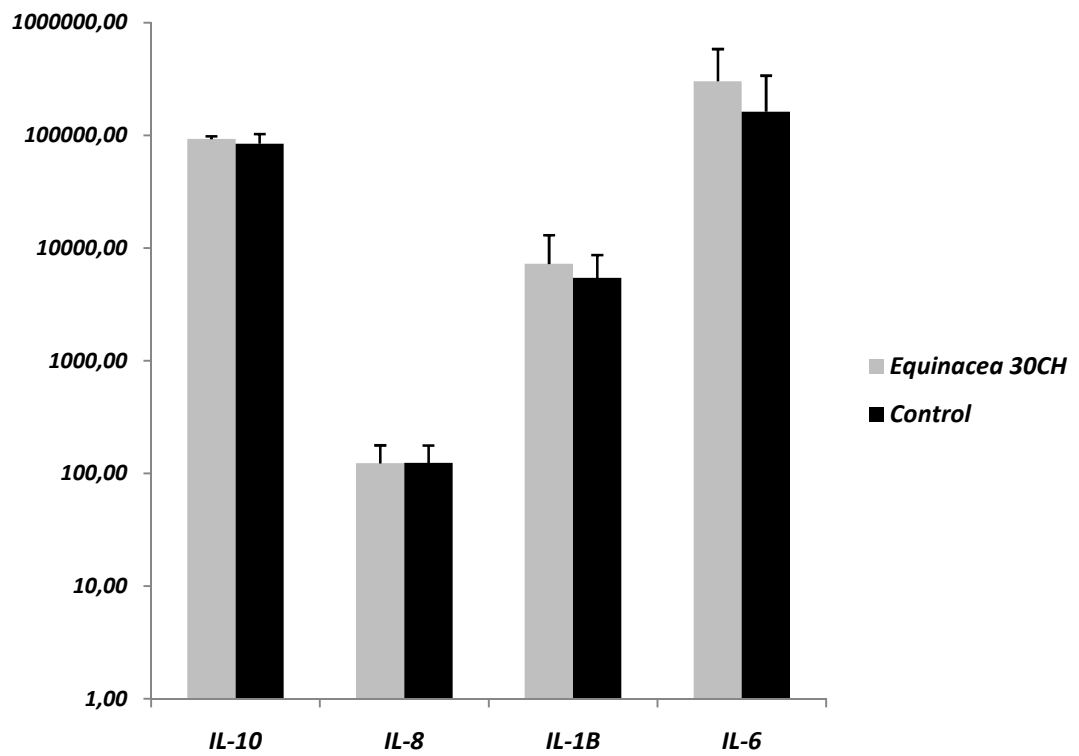
Conservar a 2-8 °

## FIGURAS

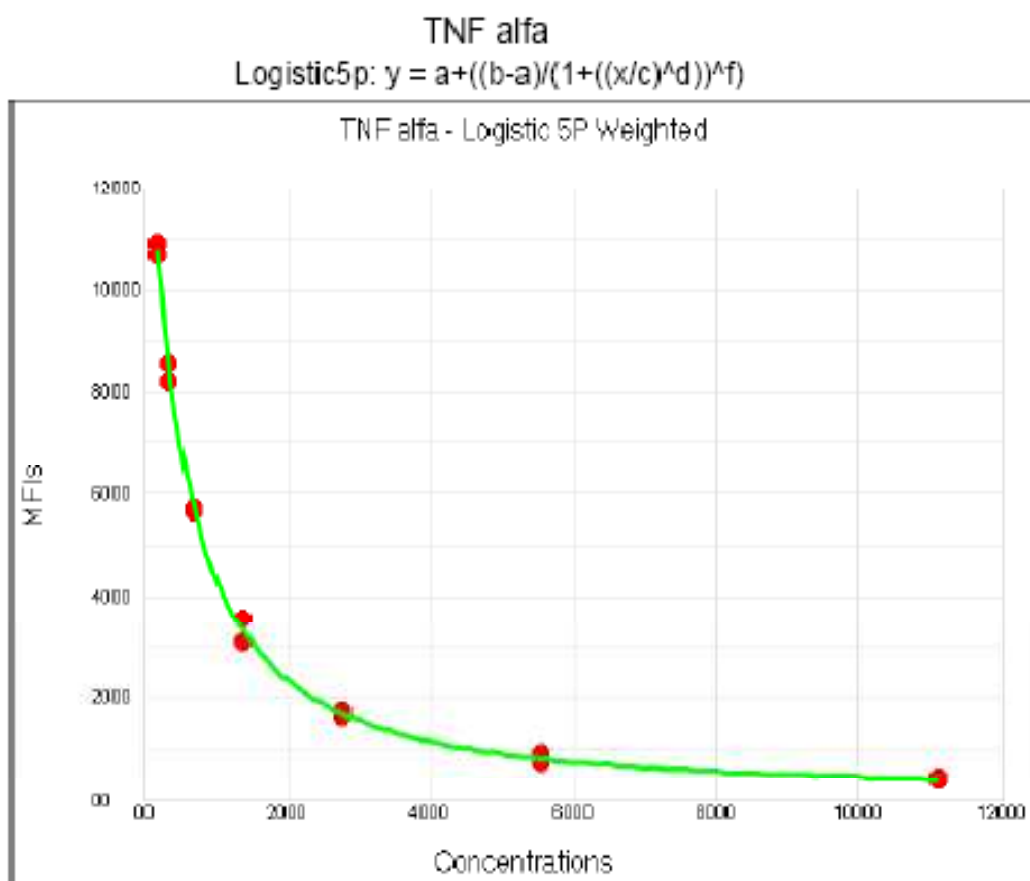
**Figura No 1. Efecto “in vitro” de “Echinacea” homeopatizada a la 30 CH sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica.**



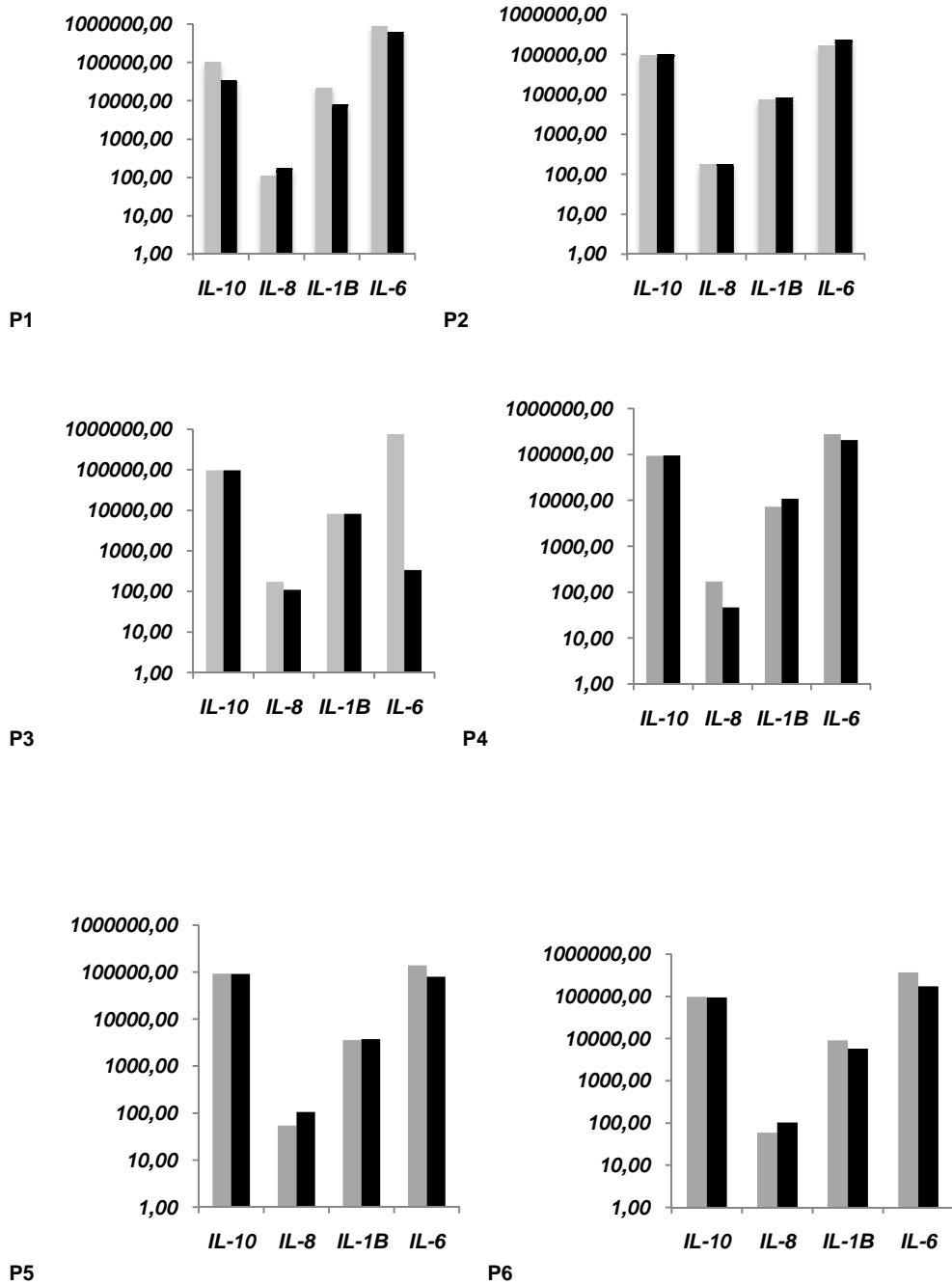
**FIGURA No2. Efecto de “in vitro” “Equinacea” homeopatizada a la 30 CH sobre los niveles de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica.**

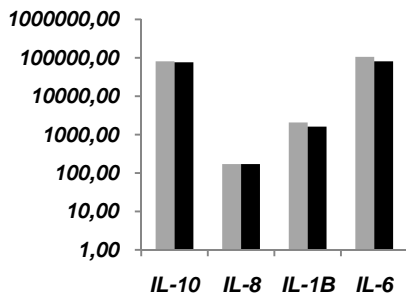


**FIGURA No3. Curva de calibración del equipo Luminex para el Factor de Necrosis tumoral.**

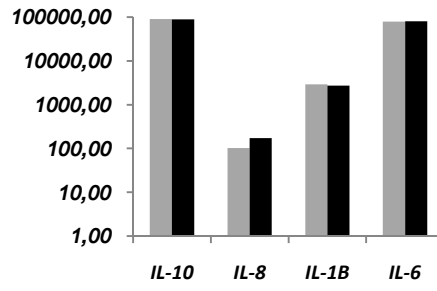


**FIGURA No4. Respuestas individuales de las células mononucleares aislada de la sangre periférica expuestas a “Echinacea” homeopatizada a la 30 CH de los pacientes 1 a 10**

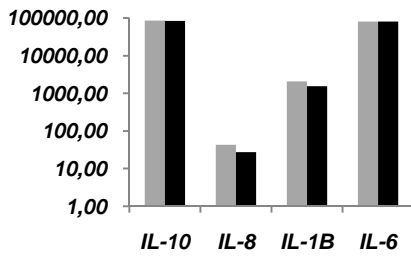




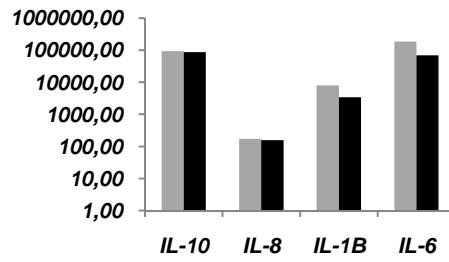
P7



P8



P9



P10

## TABLAS

**TABLA No1. Efecto “in vitro” de “*Echinacea*” homeopatizada a la 30 CH  
Sobre la viabilidad de celulas mononucleares de sangre periférica.**

<b>DOSIS</b>	<b><i>ECHINACEA</i></b>
<b>2<math>\mu</math>l</b>	<b>116,096334</b>
<b>4 <math>\mu</math>l</b>	<b>114,748542</b>
<b>6 <math>\mu</math>l</b>	<b>109,265838</b>
<b>8 <math>\mu</math>l</b>	<b>112,687399</b>
<b>10 <math>\mu</math>l</b>	<b>108,835513</b>
<b>12 <math>\mu</math>l</b>	<b>120,544784</b>
<b>14 <math>\mu</math>l</b>	<b>140,910014</b>
<b>CONTROL</b>	<b>100</b>



**TABLA No2. Respuesta individual de la IL 1  $\beta$  en células mononucleares aislada de la sangre periférica de cada paciente expuestas a “*Echinacea*” homeopatizada a la 30 CH vs control.**

PACIENTES	IL 1 $\beta$	CONTROL	DIFERENCIA	95% CI OF DIF
1.000	21976	8200	-13776	-31271 to 3719
2.000	7304	8200	896,1	-16599 to 18392
3.000	8200	8200	0	-17495 to 17495
4.000	7285	10862	3577	-13918 to 21072
5.000	3605	3732	127,6	-17368 to 17623
6.000	9062	5764	-3298	-20793 to 14198
7.000	2093	1606	-486,9	-17982 to 17009
8.000	2909	2731	-178,3	-17674 to 17317
9.000	2067	1553	-514,5	-18010 to 16981
10.00	7972	3425	-4547	-22043 to 12948

**TABLA No 3 Respuesta individual de la IL6 en células mononucleares aislada de la sangre periférica de cada paciente expuestas a “*Echinacea*” homeopatizada a la 30 CH vs control.**

PACIENTES	IL-6	CONTROL	DIFERENCIA	95% CI OF DIF
1.000	862956	625765	-237192	-1,104e+006 to 629896
2.000	166704	230206	63502	-803586 to 930589
3.000	755737	336,8	-755400	-1,622e+006 to 111688
4.000	277058	205253	-71805	-938892 to 795283
5.000	140195	80469	-59726	-926813 to 807362
6.000	370022	174181	-195842	-1,063e+006 to 671246
7.000	105550	80469	-25081	-892169 to 842007
8.000	79145	80469	1324	-865764 to 868412
9.000	80469	80469	0	-867088 to 867088
10.00	188257	70072	-118186	-985273 to 748902

**TABLA No4. Respuesta individual de la IL 8 en células mononucleares aislada de la sangre periférica de cada paciente expuestas a “*Echinacea*” homeopatizada a la 30 CH vs control.**

<b>PACIENTES</b>	<b>IL-8</b>	<b>CONTROL</b>	<b>DIFERENCIA</b>	<b>95% CI of DIF</b>
1.000	113,1	171,9	58,79	-163,2 to 280,8
2.000	171,9	171,9	-0,009995	-222,0 to 222,0
3.000	171,9	110,6	-61,28	-283,3 to 160,7
4.000	171,2	46,78	-124,4	-346,4 to 97,56
5.000	54,15	106,3	52,12	-169,9 to 274,1
6.000	58,97	103,1	44,09	-177,9 to 266,1
7.000	171,9	171,9	-0,03	-222,0 to 222,0
8.000	102,5	171,9	69,39	-152,6 to 291,4
9.000	42,68	27,55	-15,13	-237,1 to 206,9
10.00	171,9	158,1	-13,79	-235,8 to 208,2

**TABLA No5. Respuesta individual de la IL 10 en células mononucleares aislada de la sangre periférica de cada paciente expuestas a “*Echinacea*” homeopatizada a la 30 CH vs control.**

<b>PACEINTES</b>	<b>IL-10</b>	<b>CONTROL</b>	<b>DIFERENCIA</b>	<b>95% CI of DIF</b>
1.000	100503	34776	-65728	-141272 to 9817
2.000	92973	98537	5564	-69980 to 81109
3.000	97573	96542	-1032	-76576 to 74512
4.000	94161	94291	129,8	-75415 to 75674
5.000	92447	91029	-1418	-76962 to 74126
6.000	97835	93903	-3933	-79477 to 71612
7.000	81602	75844	-5758	-81303 to 69786
8.000	90922	89401	-1521	-77065 to 74023
9.000	86120	83586	-2534	-78078 to 73010
10.00	93709	88027	-5682	-81226 to 69862