



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Efecto de Árnica Montana L. Homeopatizada,
en la Regulación de Citoquinas
Proinflamatorias y Antiinflamatorias en
Cultivos Celulares de Linfocitos T Humanos**

John Eduardo Bastidas Meza

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Medicina Alternativa – Homeopatía
Bogotá, D.C.
2012**

**Efecto de Árnica Montana L. Homeopatizada,
en la Regulación de Citoquinas
Proinflamatorias y Antiinflamatorias en
Cultivos Celulares de Linfocitos T Humanos.**

**John Eduardo Bastidas Meza
Código: 05598284**

**Trabajo de Grado para optar al 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**

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Medicina Alternativa – Homeopatía
Bogotá, D.C.
2012**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Bogotá, D.C. 2012

Resumen

La homeopatía es considerado un sistema médico complejo estructurado en términos teóricos Y simbólicos configurando una racionalidad medica de la morfología humana basado en la doctrina del vitalismo que se rige por los principios de la individualidad la similitud y la experimentación pura y las dosis infinitesimales(1)

El Árnica Montana una planta denominada así primariamente por ser encontrada en las montañas y sus hábitat natural es en la península escandinava, sur de Europa, Norteamérica entre otros. Ha sido utilizada por propiedades farmacológicas básicas como analgésico y antiinflamatorio.

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de el árnica montana en su forma homeopática en la viabilidad celular y la regulación de IL6 sobre las células mononucleares de personas sanas in vitro. Esto en diluciones homeopáticas(6CH,15CH,30CH,60CH,200CH,y 1000CH).

Los resultados mostraron que el árnica montana tiene un efecto proliferativo sobre las células mononucleares de pacientes sanos en las diferentes diluciones a las 48 y 72 horas es de anota que en la 200CH y 1000 CH son estadísticamente significativas. En cuanto a la cuantificación de IL6 se observa que responden de una manera diferente a cada una de las diluciones pero se conserva que a la dilución 200CH y 1000CH son las que producen mayor cantidad de IL6.

Vemos claramente que las diferentes diluciones tienen deferentes respuestas en los diferentes individuos confirmando el principio de la individualidad premisa fundamental y básica de la homeopatía.

Palabras clave: Homeopatía, arnica montana, células mononucleares, enzimas, análisis.

Abstract

Homeopathy is considered a structured medical system in theoretic and symbolic terms by configuring a medical rationality of the human morphology based on the doctrine of vitalism, which is governed by the principles of individuality, the resemblance and the pure experimentation as well as the infinitesimal doses. (1)

Arnica Montana is a plant named as such primarily for being found in the mountains and its natural habitat is the Scandinavian peninsula, south of Europe and North America, among others. It has been used due to its basic pharmacological properties as painkiller and antiinflammatory.

The purpose of this study was to determine the effect of the arnica montana in its homeopathic form in the celular feasibility and the regulation of IL6 on the mononuclear cells of healthy in vitro persons. This is done in homeopathic dilutions (6CH,15CH,30CH,60CH,200CH, and 1000CH).

The results showed that the arnica montana has a proliferate effect on the mononuclear cells of healthy patients in the different dilutions at 48 and 72 hours. It must be highlighted that in the 200CH and 1000 CH, they are statistically significant. With respect to the quantification of IL6, it can be remarked that they respond differently to each of the dilutions but it is observed that the 200CH and 1000CH dilutions are those that produce a higher quantity of IL6.

We clearly see that the different dilutions have different responses in the different persons, thus confirming the principle of individuality, essential and basic premise of homeopathy.

Key Words: Homeopathy, arnica Montana, mononuclear cells, enzyme, analysis.

Contenido

	Pág.
Resumen y Abstract	VII
Introducción	¡Error! Marcador no definido.1
1. Justificación	3
2. Objetivos.....	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. Marco teórico	7
3.1 Homeopatía	7
3.2 Arnica montana	12
3.2.1 Actividad farmacológica	13
3.2.2 Precauciones y reacciones adversas	13
3.2.3 Interacciones	14
3.2.4 Presentaciones.....	14
3.3 Inmunidad.....	14
3.4 Inflamación	15
3.5 Citoquinas	16
3.5.1 Proinflamatorias.....	18
3.5.2 Antiinflamatorias.....	21
4. Materiales y métodos	25
4.1 Tipo de estudio.....	25
4.2 Población y muestra.....	25
4.3 Compuesto	26
4.4 Obtención de las células mononucleares de sangre periférica	26
4.5 Evaluación del efecto de Árnica montana sobre la viabilidad celular de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos.....	26
4.6 Evaluación de los niveles de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica tratadas con Arnica montana	28
4.7 Análisis estadístico.....	28

5. Resultados	29
5.1 Efecto de Árnica montana sobre la viabilidad de células mononucleares a las 48 y 72 horas de exposición	29
5.2 Cuantificación de IL-6 frente a la exposición de Árnica montana en diferentes diluciones.	29
6. Discusión de resultados	31
7. Conclusiones y recomendaciones	39
Anexos	41
Bibliografía	49

Lista de Siglas

CH:	Centesimal Hahnemanniana
Ig:	Inmunoglobulina
IL 1	Interleuquina 1
IL 2:	Interleuquina 2
IL 4:	Interleuquina 4
IL 6:	Interleuquina 6
IL 8:	Interleuquina 8
IL 10:	Interleuquina 10
IL 12:	Interleuquina 12
IFN- γ :	Interferón gama
LAF:	Factor Activador de linfocitos
NK:	Natural Killer
TNF α :	Factor de Necrosis Tisular alfa.
TGF beta:	Factor de crecimiento transformante beta
Th1:	Linfocitos T Helper 1
Th2:	Linfocitos T Helper 2
PCR:	Proteína C Reactiva
PDGF:	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
TGF:	Factor Transformador de Crecimiento
TM:	Tintura Madre

Introducción

Es evidente el auge de la homeopatía como una de las mal denominadas medicinas alternativas. Muchas personas prefieren la homeopatía en lugar de la medicina convencional o la utilizan como segunda opción en los casos en los que no se han hallado resultados satisfactorios con los métodos terapéuticos oficialmente conocidos. A pesar de que algunos artículos demuestran las bondades de la homeopatía, hay quienes cuestionan la efectividad de la homeopatía denunciando que los resultados positivos están relacionados con el efecto placebo.

A partir de las anteriores reflexiones nace la necesidad de realizar esta investigación que de continuación al trabajo de tesis titulado “Efecto del *Árnica Montana L.* homeopatizada en la regulación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en cultivos celulares de linfocitos T humanos”. El objetivo principal del estudio es determinar el efecto de *Árnica montana L.* homeopatizada, en la regulación de la Interleuquina 6 (citoquinas pro y antiinflamatorias) en cultivo celular de linfocitos T, de personas sanas (a los que se les induce artificialmente un proceso inflamatorio *in Vitro*) para evaluar la relación del medicamento con la respuesta inflamatoria aguda y así saber en qué momento posterior al inicio de la patología inflamatoria se puede administrar este medicamento. De igual manera el estudio permitirá entender el por qué se utilizan en homeopatía diferentes diluciones comenzando por aquella más baja y luego se utilizaran otras exponencialmente, dado que la respuesta inflamatoria es diferente y puede tener variaciones a partir del empleo del *Árnica montana* bajo diferentes diluciones.

En síntesis, la pregunta de investigación que pretende responder este estudio es ¿Cuál es el efecto de Árnica montana L. homeopatizada, en la regulación de las citoquinas pro y anti-inflamatorias en cultivo celular de linfocitos T, de personas sanas a los que se les induce artificialmente un proceso inflamatorio in Vitro?

1. Justificación

Los capítulos son las principales divisiones del documento. En estos, se desarrolla el Esta investigación tiene como objetivo dar continuación al trabajo de tesis titulado “Efecto del Árnica Montana L. homeopatizada en la regulación de citoquinas pro inflamatorias y antiinflamatorias en cultivos celulares de linfocitos T humanos”, en donde se dejó plasmada la metodología para generar un nuevo estudio que ayude al entendimiento del posible mecanismo de acción del medicamento Arnica en el proceso de inflamación. Este protocolo se realiza en células humanas dado que hasta el momento, solo se ha realizado en animales.

Otra de las ideas de desarrollar este proyecto de investigación, es profundizar en el conocimiento de esta sustancia de origen vegetal que es usada comúnmente en la parte clínica y así poder dar el soporte científico requerido por nosotros para ayudar a nuestros pacientes.

Como vemos, el proceso de la inflamación está asociado comúnmente al fenómeno del dolor y la fiebre dados sus vías comunes de origen haciendo de esta investigación algo muy interesante.

Este proceso de fundamentación real del uso de sustancias antiinflamatorias de uso común como lo es el Árnica Montana en forma homeopática (entendiendo esta como diluida y succionada según la forma Hahnemanniana) hace de este tema no sólo un interés propio sino de toda la comunidad médica.

Al realizar de forma rigurosa la metodología de estudio del uso de estas sustancias que muestren o no una evidencia racional y entendible para el uso de

estas, nos ayudará a continuar el camino de la utilidad del laboratorio como herramienta empírica para la demostración de hechos que puedan ser tangibles y utilizables para la demostración de ciertos efectos de determinados medicamentos en post del bienestar del ser humano.

Al motivar la investigación de ésta y otras sustancias como lo promueve el maestro Hahnemann en hombres sanos (cultivo celular) para observar los resultados aunque sea parcialmente en este tipo de experiencias, nos ayudara a explorar nuevos conocimientos acerca de la sustancia Arnica Montana completa como es en su uso homeopático no solo el de las flores como se describe en otros estudios realizados en animales y así apoyar la documentación del uso de esta sustancia en los problemas clínicos que se anotan en las materias medicas clásicas.

Aprender a utilizar los valiosos recursos existentes hoy en el mundo y en la universidad para estudio de fenómenos no aclarados y comúnmente usados en la práctica clínica homeopática hace que la Universidad Nacional de Colombia como parte de este contexto lidere este tipo de investigaciones llamadas no convencionales hasta la fecha.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de *Árnica montana* L. homeopatizada, en la viabilidad celular y regulación de IL-6 sobre células mononucleares de personas sanas in vitro.

2.2 Objetivos específicos

1. Establecer la respuesta inmunomoduladora bajo las diluciones homeopáticas 6, 15, 30, 60,200 y 1000 Centesimal Hahnemanniana (CH) de *Árnica montana* sobre células mononucleares de sangre periférica in vitro.
2. Determinar el efecto de dinamizaciones de *Árnica montana* 6, 15, 30, 60,200 y 1000 CH sobre la viabilidad de células mononucleares de personas sanas a las 48 y 72 horas de tratamiento
3. Determinar el efecto de dinamizaciones de *Árnica montana* 6,15,30,60,200 y 1000 CH sobre los niveles de IL-6 en células mononucleares de personas sanas por la técnica de Elisa
4. Observar las condiciones de viabilidad de células mononucleares in vitro.

3. Marco teórico

3.1 Homeopatía

Definición: La homeopatía hace parte de los denominados sistemas médicos complejos en el cual encontramos estructurados en términos teóricos y simbólicos que configuran una racionalidad médica tanto en la morfología humana, en la dinámica vital, la doctrina como en el sistema diagnóstico y terapéutico. En cada uno de ellos se determinan sus cualidades, en la homeopatía, la fisiología que es la dinámica vital humana, con su movimiento de vitalidad, su equilibrio y desequilibrio en el cuerpo, da origen a causas en las entidades nosológicas, y la morfología humana determina la forma y la estructura de organización del cuerpo, similar a los enfoques ortodoxos de la medicina. La doctrina médica o corpus doctrinario nos da la imagen de lo que es posible tratar o curar y lo que no pertenece al cuerpo médico como proceso mórbido, esto nos ayuda a identificar el pronóstico de lo que es posiblemente tratable o no, ayudándonos a conformar la clínica.

El sistema de diagnóstico inherente a cada proceso mórbido estudia su naturaleza, sus propios, ciclos vitales o fases y evoluciones probables, orientándonos hacia sus orígenes o causas nos ayudan a orientar la intervención bajo el sistema terapéutico homeopático, brindándole las posibilidades de recuperación de la salud en aquella entidad, reforzando el concepto y la representación de nuestro sistema homeopático.

La homeopatía es un sistema médico, que promueve la estimulación de los mecanismos de autocuración de los seres vivos, teniendo en cuenta la influencia

del medio ambiente sobre cada persona, elaborando los medicamentos homeopáticos a partir de sustancias naturales de los diferentes reinos. Deriva de las raíces griegas : homeios: similar y phathos: sufrimiento o enfermedad determinando el método de tratar enfermos con medicamentos preparados a partir de sustancias que experimentalmente producen síntomas en personas en aparente estado de salud semejantes a los sufrimientos de los enfermos. Tiene en cuenta al ser humano como una sola unidad mente, psiquis, cuerpo físico, con una energía vital que los integra, y mantiene (1).

La medicina homeopática se desarrolla a partir de las minuciosas observaciones y estudios desarrollados por el médico alemán Samuel Hahnemann a finales del siglo XVIII y se sustenta en unos principios básicos dentro de los que se destacan: Similitud, experimentación pura, individualidad, dosis infinitesimales y el vitalismo.

a. Similitud. Se refiere a la capacidad que tienen los medicamentos homeopáticos de curar enfermos con síntomas similares a los que se producen en el procedimiento de experimentación pura en personas en aparente estado de salud (1).

Según lo anotado por Hahnemann¹ en el párrafo 27, el poder curativo seguro, radical, rápido y definitivo de un medicamento depende de sus síntomas semejantes a la enfermedad y simultáneamente más fuertes (2).

b. Experimentación Pura. Es el método que utiliza la homeopatía para investigar y descubrir los efectos que caracterizan a los medicamentos homeopáticos, que se experimentan en el hombre en aparente estado de salud.

¹ Ibid., p. 105-106

Esta metodología se utiliza para saber qué hay de curativo en una sustancia a experimentar. Todos los medicamentos homeopáticos son sometidos a este método antes de administrarles a los enfermos la sustancia medicinal (1).

c. Individualidad. Cada ser vivo es único, con un conjunto de características propias que lo distinguen de los demás miembros de su especie. Cada ser humano tiene singular manera de sentir, reaccionar, expresar sus sensaciones, asumir la enfermedad, de acuerdo al aforismo hipocrático “no hay enfermedades sino enfermos” (3).

Para el médico homeópata es muy importante además conocer los antecedentes familiares del paciente, el medio ambiente donde se relaciona, la forma como presenta los síntomas cuando se enferma, con sus modalidades reaccionales propias.

La individualidad se aplica además a los medicamentos “Cada medicamento tiene una acción peculiar sobre la constitución humana, que otros medicamentos de diferente clase no producen exactamente de la misma manera” (parágrafo 118). (2)

c. Vitalismo. La fuerza o energía vital anima al organismo tanto en el estado de salud como de enfermedad, la homeopatía busca devolver el estado de equilibrio alterado por las afecciones mórbidas de la enfermedad. De acuerdo a lo escrito en el parágrafo 9: “En el estado de salud, la fuerza vital (autocrática) que dinámicamente anima el cuerpo material (organismo), gobierna con poder ilimitado y conserva todas las partes del organismo en admirable y armoniosa operación vital, tanto a las sensaciones como a las funciones, de modo que el espíritu dotado de razón que reside en nosotros, puede emplear libremente estos instrumentos vivos y sanos para los más altos fines de nuestra existencia (2).

d. Dosis infinitesimales. El principio de las dosis infinitesimales, hace referencia a la características de los medicamentos homeopáticos en su forma de preparación, es decir ser diluidos en forma progresiva y dinamizados entre

cada dilución, llegando a superar en muchas ocasiones el número de Avogadro ($6,023 \times 10^{-23}$) que designa el límite de la presencia molecular, es decir no hay presencia de moléculas permanentes de las sustancias biológicas diferentes del agua, alcohol o lactosa utilizados en su preparación(1).

Hahnemann en el curso de sus experimentos fue disminuyendo la dosis para evitar efectos tóxicos de sustancias conocidas en la época como venenosas y su método logró la virtud de desarrollar por el frote y la agitación su poder medicinal.

e. Dinamización. La dinamización es un método propio de la homeopatía (Parágrafo 269), para lograr el máximo efecto curativo de los medicamentos, potenciando su poder medicinal. Se realiza mediante la acción mecánica sobre las partículas frotando y/o sacudiendo. Sus productos son las dinamizaciones o potencias en diferentes grados (2)

Terapéutica homeopática

La terapéutica homeopática está basada en la administración de medicamentos preparados bajo un método exclusivo y propio de la homeopatía, que consiste en: Diluir y dinamizar el medicamento: donde la dilución hace referencia a la cantidad de soluto (sólido o líquido) en una cantidad determinada de vehículo solvente dando como resultado una solución de concentración determinada; y la dinamización referencia la administración de energía cinética al recipiente por medio de golpes secos y fuertes (sucusión), a fin de hacer que se manifieste toda su potencialidad terapéutica latente (1).

Escalas. Se conocen tres escalas según el grado de dinamo- dilución. Estas escalas son: decimal, centesimal, cincuenta milésima (1).

Decimal. La proporción para esta escala es 1/9 y cada una contiene la décima parte de la anterior. Escala ideada por Hering. (Nomenclatura X o D)

Centesimal. Es la escala clásica de Hahnemann, el factor de dilución es 100, cien veces más diluida, 1/100 (Nomenclatura: C ó CH).

Cincuenta milésimal. Cincuenta mil veces más diluida (Nomenclatura: LM o 0/..). Requiere un método especial para su preparación, siguiendo lo descrito por Hahnemann en el párrafo 270 de la sexta edición del Organón (2).

3.2 Àrnica montana

Existen varias teorías sobre el origen de su nombre algunos dicen que proviene de la palabra griega, Ptarmikos debido a su capacidad de producir estornudos y "Montana" porque su hábitat son las montañas (5). Por otro lado se dice que proviene del griego "Arnakis" debido al parecido de los sépalos de pelos que cubren las flores con el abrigo de cordero (4).

Es también conocida entre otros como árnica de las montañas, estornudadera, tabaco de montaña, quina de los pobres, Tabaco del diablo, Tupa de montaña, Hierba santa, Hierba de las caídas (4-6).

Es una [especie fanerógama](#) perteneciente a la familia de las compuestas, cuyo hábitat se encuentra desde la península Escandinavia hasta el sur de Europa, en el sur de Rusia y Asia central y en América del norte (4-6).

Las características generales de la planta son: crece entre 20 y 50 centímetros, su tallo es erguido, con escasas ramas, da flores amarillas con hojas dentadas, peludas y de color verde brillante. Florece entre los meses de abril y mayo. De la planta se recolectan sus capullos y sus raíces. Las primeras se recogen antes de abrirse y se dejan secar al aire libre, aunque si se va a utilizar como tintura la preparación se puede realizar inmediatamente se recoge. Las raíces se recolectan, se dejan secar y se guardan en tallos herméticos. (4-6)

Sus principales componentes son: sesquiterpenlactonas, helenanina y 11 alfa, 13 dihidrohelenanina; Ácidos grasos de cadenas cortas entre los que están: ácido acético, ácido isobutírico, ácido 2- metilbutírico, ácido metilacrilico, ácido isovalérico o ácido tiglico, linoleico, linolénico y palmítico (7,8) ; Aceites esenciales volátiles como: timol, ésteres de timol, compuestos alcanforados y poliacetilenicos); (7,8) Las flores contienen Flavonoides (isoquercitina y astragalina); derivados del ácido quínico y arnicina. (7,8) Derivados del ácido cafeico: ácido clorogénico, ácido 1,5-dicaféoil quínico;(7,8) Hidroxicumarinas (7,8); Polinas: como tri-dec-1-en-penta-3, 5, 7,9 11-in (7,8)

La sesquiterpenlactonas helenanina y 11 alfa, 13 dihidrohelenanina son lactonas sesquiterpénicas. Estos compuestos químicos pertenecen a la familia de los terpenoides, y son una clase de sesquiterpenoides (Terpenoides C15) con un anillo lactónico (9). Están constituidos por isoprenoides conformados por unidades de isoprenos de 5 carbonos. La concentración de estos terpenos en el árnica varía de acuerdo a la zona en que es cultivada dicha planta (10).

3.2.1 Actividad farmacológica

Las lactonas sesquiterpénicas helenanina y dihidrohelenanina han mostrado tener actividad antiinflamatoria, analgésica y antiséptica (7,8)

El ácido galacturónico que se encuentra en las flores causa inhibición del sistema complemento y un incremento de la actividad fagocítica in vivo. (8)

La actividad antiinflamatoria del árnica se atribuye a que la helenanina A inhibe la señalización del NF- κ B porque alquila la subunidad p65 del NF- κ B e inhibe la unión del complejo y la transcripción del NF- κ B-dependiente de genes. Adicionalmente con la alquilación se inhibe la 5-lipoxygenasa, leucotrienos y CD4 sintasa que participan en el fenómeno inflamatorio (8). También existe evidencia de que este compuesto inhibe la fosforilación oxidativa, quimiotaxis y movilidad de

los neutrófilos lo que produce estabilización de los lisosomas que producen disminución de la inflamación. (11, 12).

La comisión europea tiene aprobado el uso de árnica en casos de inflamación de piel, boca y faringe, trauma contundente, reumatismo, etc. A pesar de no tener pruebas de su efectividad a nivel popular se utiliza en: edema traumático, hematomas, neuralgias, esguinces, contusiones, dolor reumático. Inflamación de la garganta y boca, forúnculos, inflamación causada por picaduras de mosquitos y flebitis. En Rusia se utiliza en hemorragia uterina, angina de pecho, insuficiencia cardiaca, caída del pelo (8).

3.2.2 Precauciones y reacciones adversas

No debe ser administrada en membranas mucosas, ojos o heridas de piel. La administración tópica puede producir reacciones alérgicas cutáneas, produce eczema y dermatitis edematosa (7,8). Su administración por vía interna puede producir alteraciones cardiacas e incremento de la presión arterial. (7,8).

3.2.3 Interacciones

Puede Interactuar con medicamentos como anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios, heparinas de bajo peso molecular, y agentes trombolíticos lo que puede predisponer al sangrado. (7,8).

3.2.4 Presentaciones

Las formas comerciales se encuentran como tinturas, aceites, ungüentos, geles, linimentos y soluciones tópicas. (7,8).

3.3 Inmunidad

Es el Conjunto de mecanismos mediante los cuales el hombre se defiende frente a diferentes agentes externos extraños. Existen dos tipos: innata y adquirida (13, 14).

Respuesta inmune: es la acción conjunta de diferentes mecanismos entre los que están componentes celulares y moleculares que defienden el organismo frente a contra agresiones externas o internas consideradas como extraños; Entre ellos están las bacterias, cuerpos extraños, tumores, etc. (13,14).

Inmunidad Innata: Está conformada por los mecanismos que actúan contra los microorganismos patógenos desde su primer contacto. Para esto no se necesita haber tenido contacto previo con dicho microorganismo. También funciona como un sistema de alarma que activa la inmunidad adaptativa cuando está iniciando una infección. (14,15).

Sus componentes son: 1- factores constitutivos 2- barreras naturales 3-moléculas de reconocimiento 4- células 5- sistemas enzimáticos 6- fagocitosis 7- inflamación (13, 14,15).

Inmunidad adquirida: Su principal característica es la de presentar respuestas específicas para cada antígeno contra los antígenos o microorganismos patógenos extraños. Se inicia con la presentación de moléculas a los linfocitos (sensibilización inmunitaria); luego de esta, en proceso que tarda aproximadamente de 7 a 10 días los linfocitos aprenden a reconocer este

antígeno y cuando tienen un próximo encuentro presentaran una respuesta que tendrá unas características importantes como son: especificidad, rapidez y eficiencia (memoria inmunitaria). La inmunidad adquirida presenta dos tipos de respuesta que son: a- la inmunidad celular: a través de los linfocitos T que se diferencian en linfocitos citotóxicas CD8+ capaces de lisar las células reconocidas como extrañas o infectadas por virus y los CD4 que a través de la producción de citoquinas y el contacto celular directo regula la función de los linfocitos T, B y monocitos. B- la inmunidad humoral: a través con los linfocitos B que producen anticuerpos o también sirven como células presentadoras de antígenos. (13, 14,15).

Hacen parte de la inmunidad adquirida: 1- células presentadoras de antígenos a linfocitos 2-linfocitos t 3- linfocitos b 4- linfocitos de memoria que guardan información del primer encuentro. (13, 14,15).

El sistema inmune tiene múltiples mecanismos para defenderse de agentes reconocidos como extraños, entre los cuales se encuentra mecanismos como la endocitosis, fagocitosis, macropinocitosis, inflamación, tolerancia, presentación de antígenos, señalización, expresión de genes y apoptosis (15).

La inflamación es el mecanismo sobre el que se centra esta tesis.

3.4 Inflamación

Existen varias definiciones para este fenómeno entre las que están:

“Es el conjunto de mecanismos de respuesta de los tejidos vivos frente a una agresión física, química, infecciosa o autoinmune, que buscan localizar, aislar y destruir un germen agresor y reparar el daño tisular producido por él“. A nivel clínico la triada clásica de inflamación es calor, rubor y dolor producidos por la vasodilatación y el incremento de la permeabilidad capilar (15).

“Es la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica (16).

Los signos de inflamación fueron descritos por primera vez por el romano Aulo C Celso en su libro “De Medicina” en este texto el autor definió los signos cardinales de la inflamación como rubor, color, tumor y dolor. (7) El médico griego Galeno de Pergamo introdujo un quinto signo, la “Functio Laesa” (pérdida de función) (16).

3.5 Citoquinas

Son moléculas de proteínas o glicoproteínas, de 30kDs cuya función es actuar como mediadores de inflamación y de respuestas inflamatorias. Participan en procesos de inmunidad innata o adquirida (interleuquinas, linfoquinas, monoquinas interferones y quemoquinas), en procesos de crecimiento y desarrollo de tejidos, activación de células del sistema inmune y mediación de la reacción inflamatoria, en la patogenia de algunas enfermedades entre otros. (17, 18).

La unión de una citoquina a su receptor específico produce una cascada de señales que conducen al control de la expresión de genes, ya sea en la “activación de genes que estimulan la activación, crecimiento y diferenciación celular, expresión de moléculas de superficie de células funcionales y la función de las células efectoras”. (18)

Su acción puede ser: 1) autocrina, cuando la célula diana es la misma célula que secreta la citocina, 2) paracrina, cuando la célula diana se localiza en las proximidades y 3) endocrina, cuando la citocina se secreta en la circulación y actúa en un lugar distante de su fuente. (18)

“A nivel estructural pertenecen a 3 familias principales: hemopoyetina; factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1, factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor, PDGF) y factor transformador de crecimiento (transforming growth factor, TGF) beta y 3-quimiocinas que son citocinas que regulan el movimiento y el tránsito celular.”(18)

Las Interleuquinas son citoquinas producidas por el sistema inmune que actúan sobre el mismo sistema y se encargan de comunicar los leucocitos. Su nombre se da de acuerdo al tipo de célula que las produce: si son linfocitos son linfoquinas, monocitos son monoquinas. Si interactúan con otras células del sistema inmune se llaman interleuquinas. (15)

Cuando una citoquina se acopla a su receptor produce: modificaciones del citoesqueleto, mensajes al núcleo para que exprese otras citoquinas, inducción de receptores específicos de muerte que inducen apoptosis. (15)

Las citoquinas actúan produciendo entre otros: Crecimiento y diferenciación de células del sistema inmune, Parálisis o muerte por apoptosis, Quimiotaxis, Activación de fagocitosis, Facilitación de adherencia de células a la matriz extracelular. (15)

En la inflamación aguda actúan principalmente la IL1 y el TNFalfa Se estimulan por endotoxinas bacterianas, inmunocomplejos y productos de linfocitos T. Su función principal es la activación endotelial. Estimulan la expresión de moléculas de adhesión que favorecen la unión y el reclutamiento de leucocitos y la expresión de más citoquinas y eicosanoides. El TNF favorece la agregación y activación de neutrófilos. La IL1 activa la producción de fibroblastos que estimulan la producción de MEC (15)

3.5.1 Proinflamatorias

Las principales son:

1- INTERLEUQUINA 1 (IL1) también llamada Factor activador de linfocitos (LAF): Es un polipéptido de 17kD producida por macrófagos activados, neutrófilos, queratinocitos y células endoteliales. Es el principal mediador de la respuesta inflamatoria en la inmunidad innata. (15, 19, 20).

La producción de la IL-1 es inducida entre otros por: TNF, la IL-2, la IL-3, la IL-12, Bacterias y sus productos, linfocitos T CD4, sustancias inflamatorias como: PCR, alfa-1-antitripsina, cristales de urato y de pirofosfato de calcio; factores de coagulación como trombina, lípidos como: factor activador de plaquetas, LDL, hiperosmolaridad, isquemia, medicamentos como colchicina, anfotericina B, etc. (19, 20).

Existen dos formas de IL1; IL-1alfa y la IL-1beta estas moléculas son sintetizadas como precursores, cada uno con un peso molecular 31 kD. Las formas maduras tienen 17 kD de peso. Los receptores de IL-1 (IL-1R) forman parte de la familia IL-1/Toll-Like (TLR), que tienen que ver con la respuesta inmune innata y la inflamación. La familia de receptores de IL-1 está formada por 9 miembros: IL-1R1, IL-1R2, IL-1R3 IL-1R4, IL-1R5, IL-1R6, IL-1R7, IL-1R8, IL-1R9. El receptor tipo I (IL-1RI) es responsable de todos los efectos biológicos de IL-1. Estos receptores se expresan en los linfocitos T, fibroblastos, condrocitos, células endoteliales y células de músculo liso. En las células se expresan pocos receptores de IL-1; Se considera que la potencialización de la respuesta de señalización se da por un fenómeno llamado amplificación que se produce luego de la unión de protein quinasas al receptor, que genera una dimerización del dominio citosólico de IL-1RI e IL-1R 3 (IL-1R-acP) esto inicia la señal, se genera reclutamiento de las protein-quinasas asociadas a IL-1R (IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M) y el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88. Posteriormente, IRAK se disocia de este complejo y se asocia con el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF-6). Más tarde por medio de fosforilaciones y desfosforilaciones en

secuencia de quinasas se activan proteínas que producen traducción y traslocación de factores transcripcionales como NF-kB y AP-1) al núcleo. (15, 16,18, 22).

IL1 y TNF alfa son las citoquinas pro inflamatorias más importante. (19).

La IL 1 tiene un importante efecto sobre la expresión de genes como: IL-1, IL-1Ra, TNF, IL-2, IL-3, IL-6, factor inhibidor de leucemia, Cicloxigenasa tipo 2, fosfolipasa A2 citosólica y. Óxido nítrico sintetasa inducible, Endotelina-1, etc. genes de: citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento de linfocitos, factores estimuladores de colonias y factores. Existe evidencia que muestra que participa en algunas enfermedades como aborto recurrente, artritis juvenil idiopática, atopía, etc. “La expresión aumentada de COX2, iNOS y PLA2, induce la producción de prostaglandina E2, óxido nítrico y factor activador plaquetario. Estos mediadores son los responsables de los principales efectos biológicos de IL-1 como son: El aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular en los sitios donde se presenta inflamación. La activación de fagocitos, proliferación de linfocitos B, Actúa también como co-estimulante de células presentadoras de linfocitos T y antígenos, hematopoyesis y resorción ósea”. (19)

2-Interleuquina 6 (IL6): Tiene un peso molecular de 25Kd. Es producida por monocitos activados, fibroblastos y células endoteliales. Macrófagos, LT y LB, granulocitos, células del musculo liso, eosinofilos, condrocitos, osteoblastos, mastocitos, células gliales y queratinocitos también las producen luego de su vejiga y cancer de cérvix. La IL-1, endotoxinas, TNF, PDGF, virus. IFN estimulan su secreción (15,21).

Sus efectos son: Es el principal responsable de la producción de proteínas de fase aguda durante los procesos inflamatorios, estimula la producción de [ACTH](#) en la hipófisis, interviene en la producción de [inmunoglobulinas](#), la diferenciación de [linfocitos B](#) y la activación de [linfocitos T](#) citotóxicos: La leche humana

contiene IL 6. El receptor de IL6 se expresa en las células T, Células B mitógenas, monocitos periféricos y macrófagos. Es una proteína de 449 AA y se llama CD126. La transducción de la señal involucra protein cinasa C y adenilato ciclasa (15,21).

3- Interleuquina 8 (IL 8): Su síntesis se realiza en [fibroblastos](#), [células endoteliales](#), [monocitos](#) y [macrófagos](#) y la célula dendrítica. Es un potente factor quimiotáctico de [neutrófilos](#) moviliza, activa y producen degranulación de neutrófilos, regula la producción de [proteínas](#) de adhesión y la formación de [lípidos](#) bioactivos. Amplifica la respuesta inflamatoria local y estimula la [angiogénesis](#). Su receptor es una glicoproteína dimérica y se llama CD128. (18, 20,21, 25).

4- Interleuquina 2 (IL2): compuesta por 133 [aminoácidos](#) y de peso 15,4 [kDa](#). Actúa como factor de crecimiento de los [linfocitos](#) T, induce todos los tipos de sub poblaciones de linfocitos y activa la proliferación de linfocitos B. (8,25,27) La IL-2 también regula la respuesta inmunitaria, interviene en la reacción inflamatoria estimulando la síntesis de [interferón](#), induce la liberación de [IL-1](#), [TNF-alfa](#) y [TNF-Beta](#). IL-2 es necesario para el establecimiento de la memoria inmunitaria celular, así como para el reconocimiento de auto antígenos y [antígenos](#) foráneos (21).

5- Factor de necrosis tumoral alfa (TNFa alfa): Es un glucopéptido con 185 aminoácidos y un peso de 17 kDa. Es producido por los macrófagos activados, linfocitos T estimuladas con antígenos, células NK y mastocitos activados. (27).

El incremento en su concentración es el responsable de la producción de signos de inflamación como: calor, rubor, tumor y dolor: Genera la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, estimular la activación, adhesión al endotelio y actividad microbicida de los neutrófilos, Estimular la producción de quimioquinas de los macrófagos. Inducir la angiogénesis y es un factor de

crecimiento para los fibroblastos. Principal mediador de las infecciones contra bacteria en la fase aguda. Es un pirógeno endógeno y produce fiebre. Actúa estimulando el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en los focos de infección para la erradicación de microorganismos. Caquexia en pacientes con cáncer o infecciones crónicas. También participa en el choque séptico, artritis reumatoidea, etc. (15,16, 18,23)

Posee dos receptores TNFR-1 y TNFR-2 que pertenecen a la familia TNF-tan. Si se une al receptor TNFR-1 induce apoptosis, lisis de células tumorales y necrosis hemorrágica; Si se une al TNFR-2 induce proliferación de linfocitos T. (15, 23)

Su aumento produce disminución del volumen sistólico cardiaco, trombosis micro vascular y síndrome vasopléjico, puede producir inhibición de la división de la célula madre en la medula ósea, que puede generar inmunosupresión por linfopenia y puede inducir caquexia. (15, 23, 26)

3.5.2 Antiinflamatorias

Las más importantes son:

1-Interleuquina I o antagonista del receptor de IL1: Es producida por monocitos y macrófagos. Es una proteína de 152 aminoácidos que bloquea la IL1 alfa e IL1 beta por inhibición competitiva del receptor de IL-1. (15, 16,19, 24).

2-Interleuquina 4 o factor de proliferación de linfocitos B: Es una glucoproteína de 20Kd y 129 aminoácidos. Es producida por células Th2 maduras, mastocitos y basófilos (18). Se expresa en las células Th2 CD4, basófilos, eosinófilos y NK. Influye en la diferenciación de las células Th. (18, 6, 8) Su actividad biológica es mediada por el receptor CD124. IL 4 induce la proliferación y diferenciación de células B y T, e inhibe la producción de IL1b, IL 6, IL-8, ICAM-1, óxido nítrico y TNF alfa: Debido a esta inhibición de la producción

de TNFalfa, IL1 e IL6 se utiliza en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. (15, 16, 18,24).

Esta IL juega un papel importante en la producción de Leucemia linfoide crónica, debido a que previene la muerte y la proliferación de células B malignizadas por prevenir apoptosis y no permite que se exprese el gen protector, BCL2. Contribuye a la activación y reclutamiento de mastocitos y estimula la producción de IgE vía la diferenciación de células B en células secretoras de IG E. Suprime la actividad citotóxica del macrófago, mata parásitos y producción de ácido nítrico de los macrófagos. (12, 13, 15,21).

3- Interleuquina 10 (IL10) o factor inhibidor de la síntesis de citoquinas: Es la citoquina antiinflamatoria más importante. Es una proteína de 160 aminoácidos. Es producida por linfocitos T CD8 activados en sangre periférica, por LT CD4 ayudadores, luego de activación por un antígeno específico o activación monoclonal, por linfomas de células B y por monocitos activados por lipopolisacáridos bacterianos y mastocitos. Su receptor es una proteína de 110 KDa llamado CDw210. La estructura de este receptor se parece a la del receptor del IFN. (15, 16,24).

IL-10 es un inhibidor potente de las citoquinas producidas por los linfocitos Th1, y de la producción de citoquinas pro inflamatorias por monocitos y macrófagos. La IL 10 también inhibe el TNF alfa derivado de monocitos y macrófagos, la IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, el factor estimulante de colonias de granulocitos, la expresión en la superficie de las células del complejo mayor de histocompatibilidad. También inhibe la síntesis de citoquinas tales como IFN gama (al parecer por inhibición de IL12), IL2 y TNF beta en linfocitos Th1 ayudadores. IL10 es la responsable de que las Th2 puedan inhibir la producción de citocinas por las Th1. (15, 16, 18, 24). La síntesis de IL10 por monocitos es inhibida por IL 10 e IL4. (15, 16, 24).

4- Factor de crecimiento transformante beta (TGF beta): Es una molécula de 25Kd. Existen 3 isoformas de TGf denominados: TGF-b1, TGF-b2 y TGF-b3. Es producida por diferentes células como linfocitos Th reguladores, macrófagos, plaquetas y células endoteliales (21).

La más activa es la TGF-b1. Entre sus acciones está la de suprimir la proliferación y diferenciación de células T y B y disminuir la producción de IL-2, IFN-g y TNF. También desactiva los macrófagos y monocitos. Frena la hematopoyesis e inhibe la adherencia de leucocitos al endotelio vascular y tiene un papel importante en la resolución de procesos inflamatorios y el posterior proceso de reparación de tejidos. Tiene la capacidad de antagonizar o modificar la acción de otras citoquinas o factores de crecimiento (21).

4. Materiales y Métodos

4.1 Tipo de estudio

Estudio exploratorio de investigación básica en células mononucleares de pacientes sanos.

4.2 Población y muestra

Criterios de inclusión y exclusión

Participaron en el estudio las personas que cumplieron los requisitos exigidos previa realización de la historia clínica y firmaron el consentimiento informado de una forma libre y espontánea. Se eligieron las personas que cumplieron los siguientes requisitos:

- Tener entre 20 a 40 años de edad.
- Estar en buen estado de salud sin enfermedad en curso en el momento de tomar las muestras.
- No haber tomado medicamentos convencionales u homeopáticos por lo menos 3 meses antes.
- Deben haber tenido ayuno de 8 horas
- No deben haberse desvelado una semana previa al estudio
- No deben haber ingerido licor una semana previa al estudio.
- Deben haber firmado el consentimiento informado previamente a la toma de las muestras sanguíneas.

4.3 Compuesto

Se adquirió Árnica montana en diluciones 6, 15, 30, 200 y 1000CH en Cloruro de Sodio al 0.9% fabricadas del laboratorio Laboratorios Schmidt-Nagel bajo farmacopea mundial para la preparación de tinturas madres homeopáticas centesimal Hahnemanniana.

4.4 Obtención de las células mononucleares de sangre periférica

Con el debido consentimiento informado (Anexo 1) se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de 2 individuos sanos mediante gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque por centrifugación a 400g por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, 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:

$$\text{No células} = X/4 \text{ (fd) (V) (D)}$$

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

fd= factor de dilución Azul Tripan/suspensión celular

V = 10.000 volumen de la cámara de Neubauer

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

4.5 Evaluación del efecto de Árnica montana sobre la viabilidad celular de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos

Para evaluar el efecto del compuesto Árnica Montana sobre la viabilidad celular, las células mononucleares fueron utilizadas para los ensayos inmediatamente después de ser aisladas y se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂

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 *Árnica montana* se realizó en cajas de cultivo de 96 pozos en los cuales se sembraron 1×10^5 células/pozo en un volumen total de 150 μ l 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 *Árnica montana* se llevó a cabo adicionando las dosis de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 μ l, de las diluciones 6, 15, 30, 60, 200 y 1000 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 100 μ l 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 100 μ l 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.

4.6 Evaluación de los niveles de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica tratadas con Árnica montana

Para determinar los niveles de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica tratadas con Árnica Montana homeopatizada, se utilizaron 10 voluntarios sanos que cumplieron con los criterios de inclusión.

La cuantificación de los niveles de IL-6 se determinaron sobre las células mononucleares tratadas con el compuesto homeopático con la dosis seleccionada y las diluciones 6, 15, 30, 60, 200 y 1000 CH, mediante ensayo de Elisa, utilizando el kit (IL-6 Human High sensitivity) Abcam ab46041. Se siguió el protocolo y las especificaciones del fabricante.

4.7 Análisis estadístico

Con el objetivo de evidenciar las diferencias entre los distintos tratamientos efectuados sobre la población celular, se realizó un análisis pareado no paramétrico utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo (La Jolla, CA, USA).

5.Resultados

5.1 Efecto de Árnica montana sobre la viabilidad de células mononucleares a las 48 y 72 horas de exposición

En este estudio se evaluó la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos expuestas a diferentes dinamizaciones de Árnica montana homeopatizada con el fin de determinar si el compuesto produce toxicidad y calcular la concentración letal 50 CL50. Para esto las células fueron expuestas al el compuesto homeopático a las potencias 6, 15, 30, 60, 200 y 1000CH durante 48 y 72 horas.

Se observó que Árnica montana tiene un efecto proliferativo sobre las células mononucleares de pacientes sanos con las dinamizaciones 6, 60, 200 y 1000CH a las 48 horas de cultivo (Figura 1), este resultado se evidencia en el aumento en el porcentaje de viabilidad (Tabla 1), y se observó disminución en el número de células “muerte celular” con las dinamizaciones 15 y 30CH (Figura 1, Tabla 1). A las 72 horas de exposición al compuesto se observa inducción en la proliferación celular con las potencias 200 y 1000CH siendo estadísticamente significativas (Figura2, Tabla2).

Estos resultados confirman que las células mononucleares de individuos sanos se activan con el compuesto homeopático dinamizado que se manifiesta por su capacidad de proliferar frente al estímulo de Árnica montana.

5.2 Cuantificación de IL-6 frente a la exposición de Árnica montana en diferentes dinamizaciones

Teniendo en cuenta que las células mononucleares respondieron ante el estímulo de Árnica montana con su capacidad de proliferar, se evaluó si esta proliferación se acompaña de un proceso de respuesta inmunológica mediado por citoquinas. Para esto se evaluó a partir de los sobrenadantes del cultivo de las células expuestas a cada una de las dinamizaciones de A. montana por 72 (figura 4).

Se puede observar que cada uno de los pacientes responde de manera diferente al estímulo del compuesto homeopático, según la ley de la individualidad de la homeopatía (Figura 3 y 4). Sin embargo las dinamizaciones 200 y 1000CH son las que producen mayor producción de IL-6 en todos los pacientes, hallazgo que se correlaciona con la proliferación de las células mononucleares (Figura 2). No se observa ningún tipo de modulación asociada con las dinamizaciones mayores, es decir 6, 15,30 y 60CH a nivel IL-6 cuando analizamos todos los datos unificados (Figura 5). Sin embargo, como cada persona responde diferente al estímulo del compuesto, se observan respuestas positivas dependiendo de la dinamización. La activación en la producción de IL-6 con las potencias 200 y 1000CH sugiere que la respuesta inmunológica se caracteriza por ser una respuesta inflamatoria.

6. Discusión

Árnica montana es una planta nativa de las regiones montañosas del centro de Europa, miembro de la familia Asteraceae siendo descrita por primera vez por Linneo en 1753. Se utiliza en medicina homeopática para el tratamiento de trauma por sus efectos antiinflamatorios. Otros usos incluyen el tratamiento adyuvante de afecciones crónicas como el reumatismo, la artritis, la artrosis y la gota, así como para inflamaciones musculares y dolor de espalda (29, 39,56, 58, 59, 60,62).

Al igual que los fitofarmaceúticos A. montana es una mezcla de diferentes grupos de sustancias que contribuyen a su acción general. Los componentes activos de esta planta son principalmente flavonoides (como la quercetina y sus derivados como quercetina-3-mono glucosideo y quercetina- 3-glicogalacturonico), lactonas sesquiterpénicas (SQL) (arnicolide, helenalina y dihidrohelenalina), alcoholes (arnidiol, arnilenediol, isoarnilenediol), carotenoides, aceite esencial, inulina, taninos entre otros (30, 35).

Debido a que no existen estudios in vitro utilizando este compuesto homeopático; el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto in vitro de diferentes dinimizaciones de Árnica montana homeopatizada sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica aisladas de individuos sanos, y sobre la modulación de la respuesta inmune utilizando como marcador IL-6.

Se demostró, por ensayo de citotoxicidad con MTT, que las dinamizaciones de A. montana de 6, 60, 200 y 1000CH presentan un efecto proliferativo sobre las células mononucleares a las 48 horas in vitro, y las dinamizaciones 200 y 1000 CH a las 72 horas de cultivo. Aunque las dinamizaciones 15 y 30CH producen una disminución de la viabilidad celular a las 48 horas de tratamiento, y las diluciones 6, 15, 30 y 60CH, a las 72 horas; esta disminución de la viabilidad (aproximadamente 20%) no es suficiente para producir la muerte del 50% de las células mononucleares (CL50) demostrando que los medicamentos homeopáticos debido a las bajas diluciones “ultra diluciones” disminuyen su toxicidad” (38). Con este experimento se muestra que las potencias de A. montana por encima de la 30 CH, es decir la 60, 200 y 1000CH poseen una actividad biológica que se manifiesta por la actividad mitogénica de los linfocitos y las potencias por debajo de 60CH, 6, 15 y 30CH producen el efecto contrario disminuyendo la viabilidad de linfocitos “muerte celular”.

Este hallazgo, se correlacionan con lo descrito por otros autores en donde los medicamentos homeopáticos después de la dilución 12CH han sobrepasado el número de Avogadro, es así, como en la dilución no queda la mínima porción de compuesto y el solvente es el factor central de su actividad farmacológica (40). En este sentido se cree que el medicamento homeopático ultra-diluido transfiere su información de naturaleza electromagnética al agua. Las cualidades del agua son modificadas en los procesos de preparación del medicamento por efecto de la dinamización, de tal forma que queda impregnada de la información que le transmite la tintura madre en las sucesivas diluciones y succiones, constituyendo los elementos que actúan farmacológicamente en el organismo. Esto podría explicar la persistencia de la actividad biológica de las diferentes sustancias químicas más allá del límite físico representado por el Número de Avogadro (“fenómeno homeopático) (40, 41).

Por otra parte, los resultados obtenidos en este experimento, relacionados con el efecto linfoproliferativo de *Árnica montana* desde la homeopatía se debe al efecto que produce cualquier sustancia diluida y sucusionada sobre un individuo sano (células mononucleares), a este fenómeno se le designa como patogenesia o experimentación patogenética. La homeopatía unicista denomina la experimentación patogenética como el método de investigación farmacológica por el que se investigan y descubren los efectos fisiológicos que caracterizan a los medicamentos que se experimentan en un individuo en aparente estado de salud (42). Tal como se ha podido establecer en estudios previos, en éste experimento se corrobora que las potencias por encima de la 30CH, poseen una actividad biológica que se manifiesta por la actividad mitogénica de los linfocitos.

La muerte celular que se observa en las diluciones más concentradas del compuesto 6, 15 y 30CH, podría ser explicada por el efecto que tiene la helenalina sobre la supresión de la proliferación de las células T CD4+ activadas mediante la activación de la vía mitocondrial de apoptosis por inducir la despolarización de la membrana y la inducción de arresto en el ciclo celular en la fase G2/M. (35, 36, 37).

Otro de los resultados significativos fue el obtenido al realizar la medición de la interleuquina 6 frente a la exposición a las diferentes dinamizaciones de *Árnica montana* por 72 horas. Observamos tanto una inhibición en la producción de IL-6 como una activación en su producción dependiendo de la potencia del compuesto. La sangre de los individuos sanos respondió de forma diferente a cada una de las dinamizaciones de *Árnica montana* como lo descrito en el principio de "individualización" y posiblemente por mecanismos epigenéticos. A este respecto, las dinamizaciones de *Árnica montana* 6, 15, 30 y 60CH inhibieron la producción de IL-6 en los individuos sanos, mientras que 200 y 1000CH activaron la producción de la citoquina. Estos resultados se correlacionan con la linfoproliferación que producen las potencias más bajas del medicamento 200 y

1000CH, lo que podría explicar el aumento en la IL-6 por la proliferación de las células mononucleares in vitro.

Esta linfoproliferación que produce el compuesto homeopático Árnica montana puede deberse a la modulación que ejerce la **IL-6** en la proliferación, diferenciación y maduración de linfocitos T citotóxicos por la activación de la vía de las MAPK quinasas Jak/Stat, la cuál activa factores de transcripción involucrados en supervivencia y proliferación celular (28, 35, 36, 37). Además, estos hallazgos apoyan la ley de la homeopatía de “semejanza o similitud”; en la cuál el medicamento homeopático produce los síntomas de la enfermedad en individuos sanos es así como basándose en el principio de lo similar cura lo similar, la planta es usada para curar los mismos síntomas de enfermedad en personas enfermas (38). En el caso de este estudio A. montana produce la respuesta inflamatoria deseada en las células mononucleares de individuos sanos, la cual se evidencia por la activación de la **IL-6** utilizando las potencias de 200 y 1000CH. Esta interleucina 6 en células mononucleares de individuos sanos podría actuar como un potente modulador de la respuesta inmunológica hacia la vía de inflamación (28, 39, 48, 50).

En este sentido, una función clave de la IL-6, la cual fue demostrada en ratones knock-out, es ser mediadora de la respuesta de fase aguda (45, 46). La respuesta de fase aguda ocurre cuando un estímulo inflamatorio es lo suficientemente fuerte para generar cambios sistémicos que reestablecen los mecanismos homeostáticos normales (47). Específicamente el tejido lesionado inicia una reacción local que induce activación de leucocitos, células endoteliales y fibroblastos. Esta activación resulta en la liberación de citoquinas que inducen una respuesta sistémica caracterizada por fiebre, leucocitosis y liberación de proteínas de fase aguda (APPs) (48, 49, 50).

A este respecto, se ha descrito que *Árnica montana* aumenta la actividad fagocítica de macrófagos y granulocitos (51,52). Evaluando la acción inmunológica de dos compuestos polisacáridos de *árnica montana* en cultivo celular como fucogalactoxiloglicano se encontró que este induce aumento de la fagocitosis. Además, la proteína ácida arábica 3,6 galactano produce marcados efectos de anti-complemento estimulando la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF) por parte de los macrófagos (53).

Varias evidencias experimentales han demostrado la actividad antiinflamatoria de preparados de *Árnica montana*. Un ensayo in vivo se demostró que reduce los procesos inflamatorios (39), por lo cual se utiliza como tratamiento en lesiones y heridas debido a que promueve la recuperación (54,55). Además actúa como analgésico reduciendo el grado de dolor en pacientes en postoperatorios (56, 57, 58), disminuyendo el edema por la abertura de los vasos linfáticos (59, 60). En ensayos clínicos se ha demostrado que puede apoyar el tratamiento de las enfermedades reumáticas (61), y en pacientes con osteoartritis mostró una disminución significativa en el dolor (62). Además, demostró tener efectos antifúngicos y antimicrobianos (63, 64). Sin embargo, al ser ingerida como sustancia pura puede causar efectos como vasodilatación, estasis sanguínea, hemorragias, edema y dolor en personas sanas.

La actividad antiinflamatoria de *Arnica montana*, ha sido atribuida a las lactonas sesquiterpénicas presentes en los preparados los cuales intervienen desde muy temprano en el proceso inflamatorio (Powis et al., 1994; Dirsch et al., 1998; Huang et al., 2005). A este respecto se ha descrito que concentraciones micro molares de dihidrohelenalina, helenalina, y sus derivados éster inhiben la activación de factores de transcripción NF- κ B (factor nuclear κ B) y NF-AT (factor nuclear de células T activadas). El factor de transcripción NF- κ B induce la expresión de más de 150 genes de reacción inflamatoria. Los activadores de la NF- κ B y el tipo de genes que se expresan lo convierten en un factor clave en la respuesta del sistema inmunológico. NF- κ B comprende la subunidades p50 y

p65, y está presente en forma inactiva en el citoplasma. La tercera subunidad I κ B impide el paso en el núcleo de la célula. En el caso de la inflamación o una infección bacteriana o viral, la subunidad inhibitoria I κ B se descompone, y NF- κ B se pasa a la núcleo, se une al ADN e inicia la formación de una variedad de mediadores de la inflamación de fase aguda las proteínas, las citoquinas proinflamatorias como la IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (65-66).

En comparación con otras sustancias anti-inflamatorias, las lactonas sesquiterpénicas inhiben la respuesta inflamatoria. Los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs) o los agentes antirreumáticos actúan a lo largo de la cascada inflamatoria a nivel de las enzimas del metabolismo del ácido araquidónico (67).

El principio descrito de la acción de las lactonas sesquiterpénicas helenalina y 11 α , 13-dihidrohelenalina resulta en un efecto beneficioso en el proceso inflamatorio. Esto se ha descrito para las inflamaciones crónicas como las enfermedades reumáticas en las que un nivel elevado de mediadores inflamatorios IL-1, **IL-6** y TNF- α se produce luego de la exposición a lactonas (1).

Teniendo en cuenta estos hallazgos en los que observamos tanto linfoproliferación como inducción en la expresión de IL-6 en pacientes homeopáticamente sanos, podríamos decir que Árnica montana estaría modulando la respuesta inmune en individuos sanos y este mismo efecto se esperaría tener en individuos enfermos. Para explicar esto, existen básicamente dos hipótesis para explicar el mecanismo por el que actúa la homeopatía, una de ellas es la hipótesis de “asistencia inmunológica” en la terapia antihomotóxica. Al administrarse el medicamento homeopático, en primer lugar se enfrentan directamente y de forma inespecífica a los monocitos/macrófagos. Tras la fagocitosis, los macrófagos devuelven un motivo (o segmento) de aminoácidos (una cadena de 5 a 15 aás.) de las sustancias a su superficie. Aquí ligan al

complejo MHC (complejo mayor de histocompatibilidad). De este modo los motivos se hacen reconocibles para los linfocitos (“inmaduros”-Th0-) aún indiferenciados. Éstos toman los motivos de aminoácidos, convirtiéndose así en células Th3 reguladoras. Luego, viajan por los vasos linfáticos a los nódulos linfáticos más cercanos y allí forman clones celulares “con motivos”, que entran en el torrente sanguíneo a través de las vénulas pos capilares y se reparten por todo el organismo a través de la circulación. En las áreas disreguladoras, especialmente en zonas de inflamación, atraen a las células Th3 gracias a un mecanismo químico (factores del complemento, quimosinas, etc.) en función de sus motivos, pueden reconocer a los linfocitos inflamatorios (células T4 y sus subpoblaciones: Th1 y Th2). Para ello es suficiente que las secuencias sean similares (principio de similitud de la medicina antihomotóxica), a fin de que las células Th3 se estimulen para secretar la citosina TGF- β (factor transformante del crecimiento tisular beta) y en menor medida la IL-4 e IL-10. El TGF- β es la citosina antiinflamatoria más potente del organismo. Esta citosina inhibe a las células T4 y sus células auxiliares. Al mismo tiempo, las células Th2 refuerzan su propia desactivación liberando IL-4 e IL-10, de esta forma, refuerzan considerablemente la función antiinflamatoria del TGF- β . Simultáneamente, los linfocitos B son estimulados para realizar la síntesis de inmunoglobulinas. Por eso Hahnemann, proponía diluir las sustancias tóxicas hasta el punto donde sólo tuvieran un efecto de “estimulación, basado en la modulación inmunológica (34).

7. Conclusiones y recomendaciones

Con los resultados obtenidos de este estudio se puede concluir que:

- El compuesto homeopático Árnica montana con las dinamizaciones 6, 60, 200 y 1000CH a las 48 horas de cultivo induce la proliferación de células mononucleares en sangre periférica de individuos sanos.
- El compuesto homeopático Árnica montana con las dinamizaciones 200 y 1000CH a las 72 horas in vitro induce la proliferación de células mononucleares en sangre periférica de individuos sanos.
- El efecto linfoproliferativo de las dinamizaciones de A. montana no tiene correlación con la dosis del medicamento.
- Árnica montana en dinamizaciones 6CH, 15CH y 30 y 60CHCH genera un efecto inmunosupresor sobre IL6 en PBMCs cultivados in vitro.
- Árnica montana produce inducción en la producción de IL-6 con las dinamizaciones 200 y 1000CH modulando la respuesta inmune a inflamatoria.
- Los resultados de investigación cumplen con los postulados de la homeopatía de dilución e individualización.
- Este estudio demostró que el modelo in vitro de evaluación de medicamentos homeopáticos puede servir para determinar que pacientes responden o no, a las diferentes dinamizaciones y dosis del medicamento.

A. Anexos:

Figuras y tablas

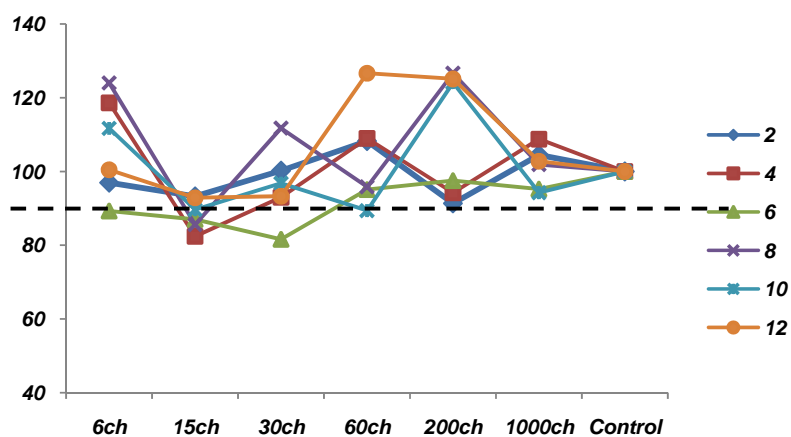


Figura 1. Efecto in vitro de Árnica montana homeopatizada sobre el porcentaje de viabilidad de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos 48 horas de exposición.

Diluciones Árnica montana	Porcentaje de Viabilidad (%)						
	6CH	15CH	30CH	60CH	200CH	1000CH	Control
2µl	96.97	93.26	100.23	108.23	91.36	104.49	100
4µl	93.26	82.39	92.98	109.01	94.2	108.77	100
6µl	100.23	86.89	81.58	95.08	97.51	95.23	100
8µl	108.23	85.59	111.76	95.83	126.66	101.87	100
10µl	91.36	89.66	96.81	89.41	124.08	94.27	100
12µl	104.49	92.86	93.29	123.64	125.10	102.78	100

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de células mononucleares de sangre periférica, 48 horas de exposición a Árnica montana

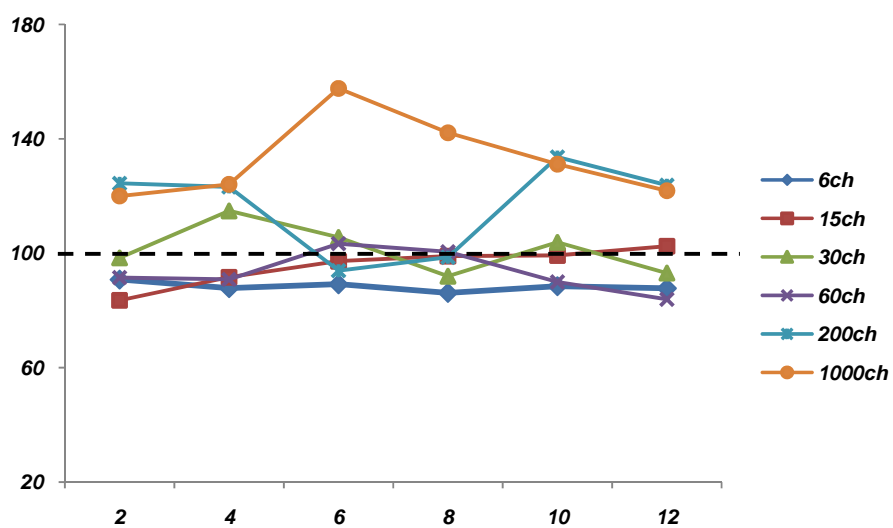


Figura 2. Efecto in vitro de *Árnica montana* homeopatizada sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos 72 horas de exposición.

Diluciones Árnica montana	Porcentaje de Viabilidad (%)						
	6CH	15CH	30CH	60CH	200CH	1000CH	Control
2µl	90,82	83,53	98,4	91,51	124,44	120,033	100
4µl	87,82	91,66	114,82	90,88	123,24	124,09	100
6µl	89,19	97,23	105,56	103,37	93,94	157,65	100
8µl	86,16	98,98	91,99	100,55	98,6	142,15	100
10µl	88,51	99,25	103,84	89,98	133,66	131,17	100
12µl	87,76	102,48	93,101	83,93	123,8	121,89	100

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad de células mononucleares de sangre periférica, 48 horas de exposición a Árnica montana

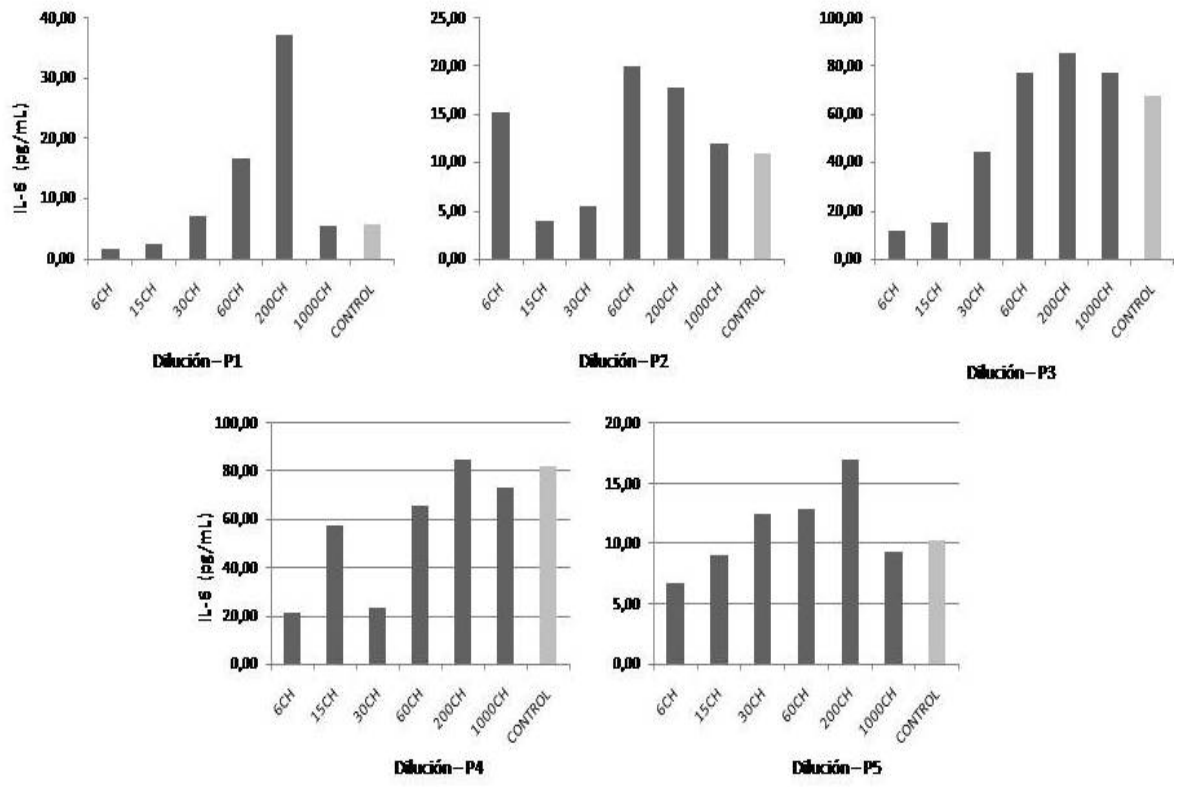


Figura 3. Efecto in vitro de Árnica montana homeopatizada sobre los niveles de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos

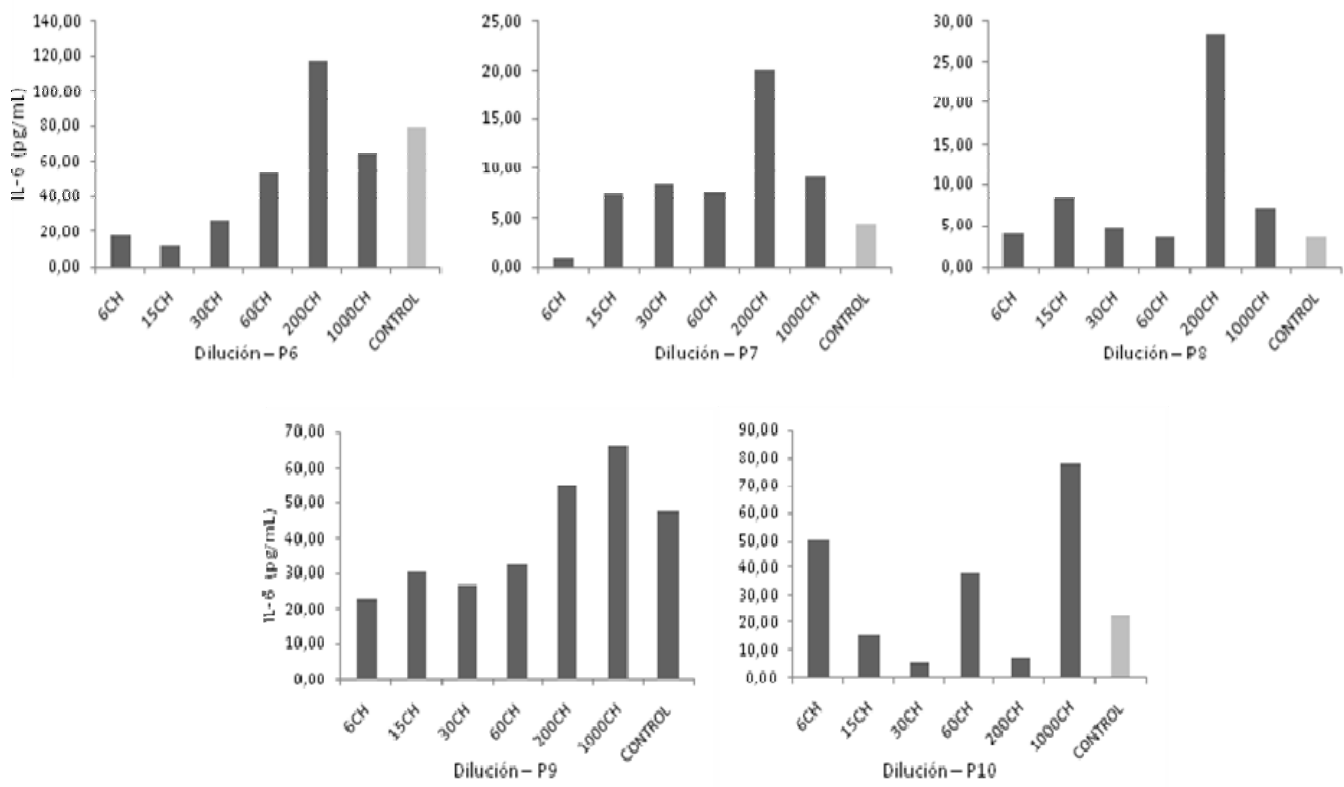


Figura 4. Efecto in vitro de *Árnica montana* homeopatizada sobre los niveles de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos.

Figura 5. Efecto in vitro de *Árnica montana* homeopatizada sobre los niveles de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos.

Bibliografía

1. Morrison B, Lilford RJ, Ernst E. Methodological rigour and results of clinical trials of homeopathic remedies. *Perfusion* 2000; **13**: 132–138.
2. Ernst E. Classical homeopathy versus conventional treatments: a systematic review. *Perfusion* 1999; **12**: 13–15.
3. Cucherat M, Haugh MC, Gooch M, Boissel J-P. Evidence of clinical efficacy of homeopathy. A meta-analysis of clinical trials. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; **56**: 27–33.
4. Ellenberger A (1998) Assuming responsibility for a protected plant: WELEDA's endeavour to secure the firm's supply of Arnica Montana. In: TRAFFIC-Europe, edg. *Medicinal Plant Trade in Europe: conservation and supply. Proceedings of the First International Symposium on the Conservation of Medicinal Plants in Trade in Europe*. TRAFFIC-Europe, Brussels, pp 127–130.
5. Hamilton AC. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodivers Conserv*. 2004; **13**(8):1477–1517
6. Ernst E, Pittler MH. Efficacy of homeopathic arnica. A systematic review of placebo-controlled clinical trials. *Arch Surg* 1998; **133**: 1187–1190.
7. República de Colombia ministerio de la protección social. *Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales*. 2008.
8. PDR FOR HERBAL MEDICINES. Ed Thomson. 3 Edicion.
9. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/slactonas2001.pdf>

10. Seemann, A. Wallner, T. Poschlod, P. Heilmann, J. Variation of Sesquiterpene Lactone Contents in Different Arnica, Montana Populations: Influence of Ecological Parameters
11. [Salminen](#), [Lehtonen](#), [Suuronen](#), [Kaarniranta](#) and [Huuskonen](#) Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2979 – 2999.
12. http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RdF_9_S1_CO_total.pdf
13. http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_01.htm
14. Steinke, JW. Borish, L. 3. Cytokines and chemokines. [J Allergy Clin Immunol.](#) 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer):S441-5.
15. *Inmunología de Rojas* Corporación para Investigaciones Biológicas (Medellín, Colombia. 2010, Decimoquinta Edición.
16. García, P. Inflamación. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.* 2008; 102:1(91-159).
17. Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics: an update. [Eur J Pharmacol.](#) 2008 28; 579(1-3):1-12.
18. Harrison, T. Fauci, A. Braunwald, E. Kasper, D.L. Harrison's Principios de medicina interna. Editorial McGraw-Hill. Madrid, 2008. Edición 17. Pg. 2019-2045.
19. Vélez-Castrillón, S. Camargo, JF. Correa, P. Anaya, JM. Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. *Revista colombiana de reumatología*, Vol. 11 no. 1, marzo 2004, pp. 11-39.
20. Alvarado-navarro, A. Interleucinas e inmunidad innata. Vol. 12/No. 4/Octubre-Diciembre, 2001.
21. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>
22. <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimicaanterior/citoquinas.htm>

23. http://www.encolombia.com/endodoncia1_cuantificacion2.htm.
24. Sarmiento, M. Guerrero, C. "Cuantificación del factor de necrosis tumoral en tejido pulpar y lesiones periapicales".
25. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000; 117(4):1162-72.
26. <http://www.iatreia.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/viewFile/341/263>
27. Name, M. (2008). Efecto de Arnica montana L. Homeopatizada, en la Regulación de Citoquinas Proinflamatorias y Antiinflamatorias en Cultivos Celulares de Linfocitos T Humanos. Universidad nacional de Colombia
28. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990; 265(3):621-636.
29. Kushner I. C-reactive protein in rheumatology. *Arthritis Rheum*. 1991; 34(8):1065-1068.
30. Livingston R. Homeopathy, Evergreen Medicine. Poole, England: Asher Press; 1991.
31. Hahnemann S. Organon of Medicine. Los Angeles: JP Tarcher; 1982.
32. Maddox J, Randi J, Stewart WW. "High-dilution" experiments a delusion. *Nature*. 1988; 334:287-91.
33. Wayne B. Jonas, MD; Ted J. Kaptchuk, OMD; and Klaus Linde, MD Ann A Critical Overview of Homeopathy. *Intern Med*. 2003; 138:393-399.
34. Fundación Instituto Colombiano de Homeopatía Luis G. Páez. Doctrina Homeopática. Bogotá: Ed. Comité publicaciones de la FICH. 2005: 92.

35. [Berges C](#), [Fuchs D](#), [Opelz G](#), [Daniel V](#), [Naujokat C](#). Helenalin suppresses essential immune functions of activated CD4+ T cells by multiple mechanisms. [Mol Immunol](#). 2009 46(15):2892-901.
36. Gertsch, J., Sticher, O., Schmidt, T., Heilmann, J. Influence of helenanolide type sesquiterpene lactones on gene transcription profiles in Jurkat T cells and human peripheral blood cells: anti-inflammatory and cytotoxic effects. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66, 2141–2153.
37. Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K. and Hirano, T. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 1999; 5, 449–460
38. Hahnemann S. *Organon of Medicine*. Los Angeles: JP Tarcher; 1982.
39. Macedo SB, Ferreira LR, Perazzo FF and Tavares JC. Anti-inflammatory activity of Arnica Montana 6cH: preclinical study in animals. *Homeopathy*. 2004; 93, 84–87.
40. Reckeweg, H. *Materia Medica Homeopática Antihomotóxica*. Ed Aurelia Velag Baden-Baden. Pg. 31-32.
41. Vals, S. *Tratado de Terapéutica Homeopática*. Librería Sintés. Barcelona 1935. Pg. 168-172.
42. Bandoel, M. *Homeopatía Los síntomas mentales de las experimentaciones puras y su desarrollo dinámico vital Tomo II*. Editorial Albatros Buenos aires. 1989. Pg. 99-135.
43. Ernst E. Classical homoeopathy versus conventional treatments: a systematic review. *Perfusion* 1999; 12: 13–15.

44. Cucherat M, Haugh MC, Gooch M, Boissel J-P. Evidence of clinical efficacy of homeopathy. A meta-analysis of clinical trials. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56: 27–33.
45. Levy, D. E. and Darnell, Jr, J. E. STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3, 656–662
46. Brivanlou, A. H. and Darnell, Jr, J. E. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 2002; 295, 813–818
47. O’Shea, J. J., Gadina, M. and Schreiber, R. D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell (Cambridge, Mass.)*. 2002; 109 (suppl.), S121–S131
48. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. IL-6-type cytokine signalling through the gp130/JAK/STAT pathway. *Biochem. J.* 1998; 334, 297–314
49. Robledo, O., Fourcin, M., Chevalier, S., Guillet, C., Auguste, P., Pouplard-Barthelaix, A., Pennica, D. and Gascan, H. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 4855–4863
50. [Heinrich PC](#), [Behrmann I](#), [Haan S](#), [Hermanns HM](#), [Müller-Newen G](#), [Schaper E](#). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. [Biochem J.](#) 2003; 374(Pt 1):1-20.
51. Wagner VH. Immunstimulierend wirkende Olyosacchaide (Heteroglykane) aus h.oheren Pflanzen. *Arzneimittel Forschung.* 1984; 34(6): 659–661; 1985; 35(7): 1069–1075.
52. Wagner H, Jurcic K. Immunologische untersuchungen vonpflanzlichen kombinationspr.aparaten. *Neimittelforschung.* 1991; 41(10): 1072–1076.

54 Efecto de Árnica Montana L. Homeopatizada, en la Regulación de Citoquinas Proinflamatorias y Antiinflamatorias en Cultivos Celulares de Linfocitos T Humanos

53. [Puhlmann J](#), [Zenk MH](#), [Wagner H](#). Immunologically active polysaccharides of Arnica Montana cell cultures. [Phytochemistry](#). 1991; 30(4):1141-5.
54. Salva J-J, Portell E. Homeopathy; Basic Principles and How to Apply Them. Cassel and Co. ISBN 1 84202 2002 119.
55. Livingston R. Homeopathy: Evergreen Medicine, Poole, Dorset, UK: Asher Press, 1991, ISBN: 0-9515410-0-5.
56. Robertson, Suryanarayanan, and Banerjee. Homeopathic Arnica Montana for post-tonsillectomy analgesia: a randomized placebo control trial. *Homeopathy*. 2007; 96, 17–21.
57. Norred CL, Zamudio S, Palmer SK. Use of complementary and alternative medicines by surgical patients. *J Am Assoc Nurse-anesth* 2000; 68(1): 13–18.
58. Jeffrey SLA, Belcher HJCR. Use of Arnica to relieve pain after carpal-tunnel release surgery. *Altern Ther Health Med* 2002; 8:66–68.
59. [Kawakami AP](#), [Sato C](#), [Cardoso TN](#), [Bonamin LV](#). Inflammatory Process Modulation Homeopathic Arnica Montana 6CH: The Role of Individual Variation. [Evid Based Complement Alternat Med](#). 2011: 917541.
60. Bonamin L. V., “Arnica Montana and behavior of connective tissue,” in *Signals and Images: Contributions and Contradictions of High Dilution Research*, L. V. Bonamin, Ed., pp. 113–125, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2008.
61. Merfort I. Arnica: new insights on the molecular mode of action of a traditional medicinal plant. [Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd](#). 2003; 10 Suppl 1:458.
62. [Knuesel O](#), [Weber M](#), [Suter A](#). Arnica Montana gel in osteoarthritis of the knee: an open, multicenter clinical trial. [Adv Ther](#). 2002, 19(5):209-18.

-
63. Lass C, Vocanson M, Wagner S, Schempp CM, Nicolas JF, Merfort I, Martin SF. Anti-inflammatory and immune -regulatory mechanisms prevent contact hypersensitivity to Arnica Montana L. Exp Dermatol. 2008; 17(10):849-57.
64. Stanciuc AM, Gaspar A, Moldovan L, Saviuc C, Popa M, Măruțescu L. In vitro antimicrobial activity of Romanian medicinal plants hydroalcoholic extracts on planktonic and adhered cells. Roum Arch Microbiol Immunol. 2011; 70(1):11-4.
65. Gerlag, D.M., Ransone, L., Tak, P.P., Han, Z., Palanki, M., Barbosa, M.S., Boyle, D., Manning, A.M., Firestein, G.S. The effect of a T cell-specific NF- κ B inhibitor on in vitro cytokine production and collagen-induced arthritis. J. Immunol. 2000; 165, 1652–1658.
66. Mattingly, L.H., Gault, R.A., Murphy, W.J. Use of systemic proteasome inhibition as an immune-modulating agent in disease. Endocr.Metab. Immun. Disord. Drug Targets2007; 7, 29–34.
67. Rüngeler P et al. Zentraler Mediator im Immunsystem und Entzündungsgeschehen. Pharm.Ztg. 1999; 2(144):10-18.