



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto de la *Echinacea angustifolia* en preparación homeopática en la expresión de citoquinas.

Camilo Andrés Cruz Castro

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina.
Maestría en medicina alternativa
Bogotá, Colombia
2012

Efecto de la *Echinacea angustifolia* en preparación homeopática en la expresión de citoquinas

Camilo Andrés Cruz Castro

Código: 05598626

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:
Magister en Medicina Alternativa

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

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina.
Maestría en medicina alternativa.
Bogotá, Colombia
2012

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Bogotá., D.C. , 2012

A mis padres, mi esposa y docentes.

Por desarrollar en mí, el amor por la ciencia y la búsqueda del desarrollo continuo del conocimiento, por enseñarme a tratar de ver más allá del final aparente de mis propios límites.

Resumen

Efecto de la *Echinacea angustifolia* en preparación homeopática en la expresión de citoquinas

Effect of the *Echinacea angustifolia* in homeopathic preparation on the expression of cytokines

Introducción: Las dificultades en el manejo de patologías infecciosas, los inconvenientes en el uso de antibióticos y la comprensión de las condiciones inmunológicas adaptativas del paciente, son ineficientes para la infección activa. En esta vía y apoyados por los estudios que describen a la *Echinacea* sp, como un estimulador de citoquinas relacionadas con la respuesta inmunológica adaptativa, por lo cual desde la homeopatía y por medio de la biología molecular, se decide probar que la *Echinacea angustifolia* 30CH es un estimulador de expresión de citoquinas de inmunidad adaptativa.

Materiales y métodos: Determinación de la expresión de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ por células mononucleares, por ELISA con inmunofluorescencia, expuesta a *Echinacea angustifolia* 30CH.

Resultados: Se evidenció una adecuada proliferación celular, no se evidenciaron diferencias significativas entre IL-2 y IL-4 frente al control, para IL-5 y IFN- γ la expresión superó los niveles esperados.

Conclusiones: La *Echinacea angustifolia* con efecto inmunoestimulador en fitoterapia, posee efecto estimulador presentando aumento del porcentaje de viabilidad celular, además se evidenció un aumento de la expresión de IL-5 e IFN- γ bajo la exposición a la preparación homeopática.

Palabras clave: Inmunidad adaptativa, citoquina, *Echinacea angustifolia* 30CH.

Abstract

Introduction: Difficulties in the management of infectious diseases, the disadvantages in the use of antibiotics and the understanding of adaptive immunological conditions of the patient, are inefficient for active infection. In this way and supported by studies that describe to the *Echinacea* sp, as a stimulator of the adaptive immune response-related cytokines, which from homeopathy and molecular biology, is decided to test that the *Echinacea angustifolia* 30CH is a stimulator of expression of cytokines of adaptive immunity.

Materials and methods: Determination of the expression of IL-2, IL-4, IL-5 and IFN- γ by mononuclear cells by ELISA with immunofluorescence, exposed to *Echinacea angustifolia* 30CH.

Results: There was a proper cell proliferation, not demonstrate significant differences between IL-2 and IL-4 against the control, for IL-5 and IFN- γ expression exceeded expected levels.

Conclusions: The *Echinacea angustifolia* with effect immunostimulant in phytotherapy, has effect stimulator presenting increasing the percentage of cell viability, also an increase in the expression of IFN- γ and IL-5 under exposure to the homeopathic preparation

Keywords: Adaptive immunity, cytokine, *Echinacea angustifolia* 30CH.

Contenido

	Pág.
Resumen y Abstract	VII
Introducción	1
1. Justificación	3
2. Objetivos	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. Marco teórico	6
3.1 Inmunología. Conceptos y generalidades.	6
3.1.1 Inmunidad adaptativa	7
3.1.2 Citoquinas	8
3.1.3 Inmunidad adaptativa y citoquina	9
3.2 Echinacea angustifolia	11
3.2.1 Generalidades	11
3.2.2 Echinacea angustifolia e inmunología	12
3.3 Homeopatía	12
3.3.1 Doctrina homeopática	13
4. Materiales y métodos	16
4.1 Metodología	16
4.1.1 Tipo de estudio	16
4.1.2 Población y muestra	16
4.1.3 Identificación de variables	16
4.1.4 Recolección, procesamiento, y análisis de información	16
5. Resultados	20
5.1 Prueba de viabilidad de células mononucleares de sangre periférica en individuos sanos.	20

X Efecto de la *Echinacea angustifolia* en preparación homeopática en la expresión de citoquinas

5.2	Cuantificación de citoquinas.	26
6.	Discusión	28
7.	Conclusiones y recomendaciones	31
7.1	Conclusiones	31
7.2	Recomendaciones	32
Anexo 1.	Consentimiento informado	33
Anexo 2.	Ficha técnica tintura madre <i>Echinacea angustifolia</i>	35
Anexo 3.	Ficha técnica análisis físico químico tintura madre <i>Echinacea angustifolia</i> . 30 CH	36
Anexo 4.	Ficha técnica medicamento homeopático <i>Echinacea angustifolia</i> 30 CH	37
	Bibliografía	43

Lista de Siglas

CH:	Dilución centesimal Hahnemanniana
D:	Dilución decimal.
HIV:	Virus de inmunodeficiencia humana.
Ig:	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IL-2:	Interleuquina 2
IL-4:	Interleuquina 4.
IL-5:	Interleuquina 5
IL-6:	Interleuquina 6
IL-9:	Interleuquina 9.
IL-10:	Interleuquina 10.
IL-13:	Interleuquina 13.
IL-17:	Interleuquina 17.
IL-22:	Interleuquina 22.
IFN- γ :	Interferón gamma
NIH:	Instituto nacional de salud de los Estados Unidos.
NK:	Natural Killer, citotóxicos o citolíticos.
TGF- β :	Factor de crecimiento transformador beta.
NF κ B	Factor transcriptor nuclear.
TNF:	Factor de necrosis tumoral.
TNF α :	Factor de Necrosis Tisular alfa.
Th:	Linfocitos T helper o cooperadores.
Th1:	Linfocitos T helper o cooperadores clase 1.
Th2:	Linfocitos T helper o cooperadores clase 2
TM:	Tintura Madre
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Introducción

Desde hace más de doscientos años la comunidad científica médica ortodoxa ha descrito a la homeopatía como un práctica compleja, la cual ha tenido sus defensores y detractores, sus defensores argumentan su tesis gracias a las descripciones de su pionero el Dr. Samuel Hahnemann (1775-1843), quien expone a la homeopatía como disciplina que se desarrolla bajo el principio de similitud “similia” o “simile”, principio que determina que cuando una sustancia es capaz de inducir una serie de síntomas en un cuerpo sano, en bajas dosis esa misma sustancia puede curar tales síntomas en diferentes circunstancias o etiologías “similia similibus curentur”.Dicho concepto no fue señalado en primera instancia por Hahnemann, pues encuentra documentación de esta descripción desde los papiros de Ebers (1500 AC), pasando posteriormente por Hipócrates (470-367 AC) y von Hohenheim (Paracelsus) (1494-1541) (1).

En este mismo orden, sus detractores, han expuesto que la homeopatía carece de bases fisiológicas, metodología clínica clásica, análisis farmacológicos desde la farmacocinética y farmacodinamia para su aprobación por parte de la medicina ortodoxa.

Es así, que desde este punto de vista y con el desarrollo técnico de las ciencias básicas, tales como la biología, la bioquímica, la genética y la inmunología, asociado a la búsqueda de nuevos conceptos que refuercen la comprensión de la actividad de un medicamento homeopático en un individuo, se han logrado evidenciar efectos desde la óptica analítica de la biología molecular, esto vale aclarar que no va en contravía de la visión de la medicina homeopática clásica y la aplicación del principio de similitud dentro de la doctrina homeopática, simplemente que autores como Benveniste, con sus estudios de actividad de medicamentos homeopáticos sobre basófilos humanos y su actividad regulatoria sobre los mismos, o los estudios de diluciones homeopáticas de Apis mellifica e histamina, en el tratamiento de síndromes alérgicos (2), por lo cual se busca profundizar en las acciones biológicas que los medicamentos homeopáticos tiene sobre la respuesta inmune adaptativa.

Es de esta forma, que en el presente estudio, busca profundizar y demostrar, bajo la comprensión de mecanismos fisiológicos que los medicamentos homeopáticos en especial las Echinacea angustifolia como preparación homeopática, poseen actividad biológica, sobre la respuesta inmunológica adaptativa.

Así las cosas, este estudio decidió tomar a la Echinacea angustifolia como medicamento de análisis, debido al uso y evidencia científica que este fármaco en su presentación fitoterapéutica ha presentado como inductor de respuesta inmunológica (3), puesto que efectos como estimulación y regulación o actividad inhibitoria microbiológica que estudios con medicamentos homeopáticos ha evidenciado (4, 5), se plantea realizar dilución homeopática de la Echinacea angustifolia a la 30CH para poder analizar su comportamiento frente a la expresión de citoquinas relacionadas con inmunidad adaptativa..

En línea con lo anterior, con la problemática actual en el manejo de cuadros en las patologías infecciosas se encuentra relacionado no solo en las posibilidades y espectros de uso de antibióticos, sino también en la respuesta inmunológica individual del paciente, presentando entonces a la homeopatía, y dentro de esta a la Echinacea angustifolia 30CH como medicamento homeopático, que generaría estímulos inmunológicos que aumentarían la respuesta inmunológica individual. Lo anterior, implica el uso de la Echinacea angustifolia 30CH como elemento terapéutico sinérgico.

1. Justificación

En la práctica clínica moderna, las enfermedades infectocontagiosas, han generado un sin número de dificultades para su tratamiento, debido a la presencia de resistencia bacteriana por parte de los microorganismos a los múltiples antibióticos que se encuentran en el mercado actualmente (6).

Es así como la identificación de errores por parte del huésped infectado para generar adecuados mecanismos de defensa, los cuales se pueden asociar a la aparición de múltiples patologías que hasta hace un corto tiempo, no se encontraba relación con posibles condiciones inmunológicas (7).

Sumado a los conceptos de la inmunología moderna, de inmunidad innata e inmunidad adaptativa, se ha planteado la discusión de usar, como mecanismo terapéutico posible la inmunoregulación, por medio de medicamentos homeopáticos buscando generar estimulación y balance en la expresión de citoquinas (8), las cuales producirían una mejor respuesta inmunológica.

Bajo este precepto, el concepto de mecanismo de defensa, entendido desde la inmunología, inicia desde la concepción de la protección contra la enfermedad, y visto desde el mismo concepto histórico, más específicamente a la enfermedad infecciosa, pero identificada como la respuesta fisiológica que se genera frente a cualquier sustancia, sea esta de carácter infeccioso o simplemente una sustancia química de características ajenas para el sistema que logran generar una respuesta inmunitaria. (9)

De esta forma, en los primeros momentos por medio de la inmunidad innata, o también conocida como natural o espontánea, y posterior en una fase tardía, la inmunidad adaptativa por medio de activación de mecanismos celulares, como sistema de defensa que aparece por respuesta a la infección, generan una activación y proliferación de

células inmunológicas tales como, linfocitos T y macrófagos, por medio de la capacidad de las diferentes citoquinas conocidas, con acción mensajera del sistema (9).

Es el caso de la Interleuquina – 2 (IL-2) que es un factor de crecimiento, supervivencia y diferenciación para los linfocitos T, tiene una función importante en la regulación de las respuestas de los linfocitos T mediante su acción sobre los linfocitos T reguladores, o el caso de el interferón gamma (INF- γ) siendo la principal citoquina activadora de los macrófagos, es así que presenta funciones fundamentales en la inmunidad celular adaptativa frente a los microorganismos intracelulares (9).

De esta misma forma, sumado a las demostraciones que se han realizado por estudios de investigación, que postulan algunos medicamentos homeopáticos generaron *in Vitro* inducción de algunas citoquinas, de esta forma se considera que el medicamento homeopático presenta posibilidades de activación de funciones en inmunomodulación (2, 4, 5, 10).

De esta forma, los reportes de la *Echinacea angustifolia*(11), así como de otros tipos de variedades de esta especie en extracto herbal, de activación de linfocitos CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ (12), plantean la posibilidad que la *Echinacea angustifolia* como medicamento homeopático, posee la capacidad de modulación específica en inmunidad adaptativa.

2. Objetivos

Como objetivo general y los objetivos específicos del presente estudio se plantean los siguientes elementos:

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto inmunomodulador de la *Echinacea angustifolia* en preparación homeopática sobre células mononucleares de sangre periférica humana.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la expresión de citoquinas involucradas en procesos de inmunidad adaptativa bajo la exposición de *Echinacea angustifolia* como medicamento homeopático a la potencia 30CH.
- Medir la expresión de citoquinas involucradas en procesos de inmunidad adaptativa, bajo el efecto de *Echinacea angustifolia* en preparación de medicamento homeopático

3. Marco teórico

En el presente, las patologías infecciosas presentan grandes inconvenientes en su tratamiento, las cuales se pueden dividir como dificultades propias de individuo tratado (ejemplo: predisposición genética, disfunción de capacidad del sistema inmune tal como los síndromes de inmunodeficiencia), condiciones del medio ambiente que facilitan la infección (ejemplo: contaminación), además de las características propias del microorganismo infectantes (ejemplo: resistencia bacteriana o mutación de nuevas cepas), por lo cual las capacidades terapéuticas se han encontrado escasas para el tratamiento de estos casos clínicos de origen infecciosos (6).

De esta forma el cuerpo médico se encuentra trabajando en nuevas formas de tratamiento, que sean más efectivas y que no se vean afectadas por las dificultades evidenciadas hasta la actualidad con los tratamientos ya puesto en práctica, es así como en la medicina alternativa y complementaria se vislumbra como un posible método de manejo terapéutico en múltiples patologías (13).

Ahora bien, la medicina alternativa y complementaria es definida por el National Institutes of Health (NIH) como: *“grupo de diversos sistemas médicos y de cuidados de salud, prácticas y productos que no son considerados ser parte de la medicina convencional”*, y donde por el aumento del uso de estas técnicas y el asocio de prácticas convencionales, se han encontrado resultados alentadores para este tipo de prácticas en tratamientos exitosos para los pacientes.

Dentro de la medicina alternativa y complementaria, se ha identificado a la homeopatía como una práctica en la cual se ha demostrado evidencia clínica con resultados alentadores, y a la Echinacea angustifolia como un remedio con posible actividad inmunológica, en el tratamiento de patologías infecciosas de diferente origen (14).

Considerando que desde la visión de la inmunología descrita por Abbas: “*sistema de defensa contra los microorganismos tiene lugar a través de las primeras reacciones correspondientes a la inmunidad innata y las respuestas posteriores a cargo de la inmunidad adaptativa*”, se podrá considerar, desde la visión de la medicina moderna, cuales capacidades inmunológicas posee este remedio homeopático, y en condiciones futuras, ser utilizado como herramienta terapéutica exitosa (9).

3.1 Inmunología. Conceptos y generalidades.

Es la inmunología denominada, desde la antigüedad por el palabra *immunitas* que desde el latín, se refiere a la protección ofrecida a los senadores como defensa frente a cualquier acción judicial durante el ejercicio de su cargo, es por esto que en la inmunología siempre ha estado inmersa en el concepto de protección y control a la enfermedad y más afondo a la enfermedad infecciosa (9).

Así mismo, los conceptos de hipersensibilidad y alergias han colocado no solo a la inmunología en el estudio de la enfermedad infecciosa, sino también en el estudio de la respuesta biológica a la entrada de cualquier sustancia ajena al organismo, lo cual es denominado como respuesta inmunitaria.

En estas condiciones, la respuesta inmunitaria está constituida básicamente por dos procesos denominados como inmunidad innata e inmunidad adaptativa, que trabajan coordinadamente para dar un respuesta efectiva, la inmunidad innata es la primera línea de respuesta frente a la presencia de un cuadro infeccioso, la cual ya se encuentra presente antes de la existencia de la infección, por lo cual es conocida también como inmunidad natural o espontánea (9).

Es necesario conocer que este sistema de defensa, tiene elementos estructurales y funcionales los cuales se pueden nombrar las barreras físicas y químicas, células fagocíticas y linfocitos citolíticos naturales, proteínas sanguíneas entre las cuales se debe resaltar los factores del sistema del complemento, los mediadores de la inflamación y las citoquinas que son las encargadas de la regulación y coordinación de las funciones del sistema inmune en forma general (9).

Es así, que frente a todos estos procesos inmunológicos la exposición a un microorganismo, exige que el sistema, se adapte frente a las condiciones de cada agente agresor. Por tal motivo, este se debe acondicionar a cualquier tipo de situación, es de esta forma, como se desarrolla el concepto de inmunidad adaptativa (9).

3.1.1 Inmunidad adaptativa

Considerando los conceptos inmunológicos, se ilustra a la inmunidad adaptativa, como aquella respuesta que busca mecanismos para adaptar una condición que sobrepase a la infección presente, de esta manera, se genera una capacidad específica para cada molécula inmunológica y así se posee una memoria que aumenta con cada exposición aun si esta se presenta de forma repetida al agente infeccioso, por esta especificidad también es llamada inmunidad específica o adquirida. Según lo anterior, y de forma específica, el concepto básico de función de la inmunidad adaptativa, es el antígeno como punto diana de la activación de linfocitos, los cuales son el componente celular primordial encargado de la secreción de anticuerpos para la generación de la denominada reacción antígeno-anticuerpo (9).

Debido a la complejidad de la inmunidad adaptativa se definen dos tipos de respuestas denominadas inmunidad humoral e inmunidad celular, la inmunidad humoral por medio de múltiples sustancias que se encuentran en el torrente sanguíneo y las secreciones mucosas, llamadas anticuerpos las cuales son producidos por los linfocitos B, cuyas funciones son las de disminuir el componente infeccioso y marcarlo para que sea este eliminado posteriormente por múltiples mecanismos. En adición, la inmunidad celular es liderada por los linfocitos T, los cuales se subdividen en Th y NK, como otro componente celular se encuentran las células presentadoras de antígenos dentro de las cuales se debe destacar, las células dendríticas, finalmente se encuentran las células efectoras entre las cuales vale la pena destacar los linfocitos T activados y los fagocitos mononucleares (9).

Es por ello que, como es descrito por Abbas en su texto de inmunología celular y molecular, como características de la inmunidad adaptativa las siguientes: especificidad y diversidad, memoria, expansión clonal, especialización, contención y homeostasis, y falta de reactividad frente al propio organismo o tolerancia.

Es así que, con los anteriores conceptos, se genera la respuesta inmunitaria adaptativa como mecanismo de defensa, la cual se evidencia por medio de tres estrategias fundamentales:

- 1). Unión de anticuerpos a los microorganismos bloqueando su capacidad de infección y favoreciendo su ingestión y destrucción.
- 2). Los fagocitos ingieren los microbios y los destruyen, para que los linfocitos Th fortalezcan sus capacidades.
- 3). Los NK citotóxicos destruyen las células infectadas a las cuales los anticuerpos no logran identificar (9).

Dentro de esta compleja red de funciones celulares se evidencia una serie de moléculas llamadas citoquinas, las cuales son el mecanismo efector de la respuesta inmunitaria, son mediadores solubles de la inmunidad innata y adaptativa, son el lenguaje utilizado por las células inmunológicas para comunicarse entre sí.

3.1.2 Citoquinas

De esta forma la inmunidad adaptativa, se encuentra fundamentalmente inmersa dentro de los mecanismos de control de información de las citoquinas, las cuales han sido descritas dentro de los campos científicos desde mediados de los años cincuenta del siglo XX, describiéndose de primera mano el IFN, en la actualidad se encuentran descritas más de 200 citoquinas reconocidas. Se han estudiado, múltiples mecanismos de control de la función de estas, generándose así, una red posibilidades de sinergias o antagonismos.

La síntesis de ellas depende de distintos linajes de linfocitos Th, en lo cual los Th1 se encuentran relacionados con la producción de INF- γ , IL-2, IL-15 y linfoxina, en contraposición los Th2 se encuentran relacionados con IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 y IL-13, y en ambos linajes celulares encontrándose la producción de IL-10, agregándose a lo anterior se encuentran los Th17 con la producción de IL-17 y IL-22, a esto se añaden, los Tr1 con la IL-10 y los Tr3 (Th3) con el TGF- β , pero no solo estos tipos celulares se han encontrados relacionas dentro la determinación de la producción de ellas, otro ejemplo se encuentran células como los CD8⁺, células NK, células B, macrófagos, queratocitos,

timocitos, células estromales de la medula ósea, eosinófilos, basófilos, fibroblastos, células epiteliales, células gliales y astrositos, entre otras (15).

Por lo cual se explica y demuestra que esta espesa red inmunológica depende de múltiples agentes, que interactúan en cientos de funciones, que dependen de un sin fin de circunstancias de variable naturaleza, inmersas en una fina coordinación fisiológica. Pero de forma más compleja, resulta la acción coordinada de célula T, macrófagos y células dendríticas y su reclutamiento en los sitios de infección e inflamación. Actualmente las citoquinas están íntimamente relacionadas con múltiples patologías entre las que se encuentran inflamación aguda, inflamación crónica (ej. artritis reumatoidea), arterioesclerosis, asma y alergias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (bronquitis crónica y enfisema pulmonar), patologías autoinmunes (Lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple), patología neurodegenerativa (Alzheimer y Parkinson) y cáncer. Por lo cual hoy en día múltiples investigaciones, se encuentran enfocadas al hallazgo de terapias con citoquinas o antagonistas de las mismas, que evidencian una nueva forma de entender biológicamente la enfermedad y sus procesos de salud, dentro de estas terapias se ha evidenciado múltiples posibilidades terapéuticas con quimioquinas y sus receptores, agonistas de receptores toll-like, supresores de la señalización de citoquinas, inhibición de la maduración de citoquinas, compuestos naturales y botánicos, además de probióticos (9,15).

3.1.3. Inmunidad adaptativa y citoquinas

Dentro de las citoquinas que se han relacionado con la inmunidad adaptativa se encuentran: IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ , TGF- β , linfotoxina, IL-13 y IL-17, con múltiples capacidades de interacción dentro de la inmunidad adaptativa (9). Con especial interés para el presente estudio por sus funciones se describen los siguientes tipos:

- IL-2

En síntesis la función primordial de la IL-2 es favorecer la proliferación de linfocitos T estimulados por el antígeno, es así que su función está dirigida al crecimiento, la supervivencia, la diferenciación y regulación de linfocitos T (9).

La IL-2 es un polipéptido glicosilado de peso molecular entre 16.000 a 20.000 Daltons, este se sintetiza de forma aguda entre las primeras 8 a 12 horas, ella requiere de un receptor celular el cual es el IL-2R, este receptor es específico para la unión de IL-2, entre ellos crean la unidad funcional de la citoquina, la cual requiere de este receptor para su adecuada regulación fisiológica, es así que se han realizado múltiples estudios de las variaciones patológica de IL-2R como origen de múltiples síndromes clínicos como: artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, diversos cuadros infecciosos y SIDA (16), en donde se ha planteado y utilizado para el manejo terapéutico como inductor de proliferación de linfocitos CD4 en paciente con infección de HIV (17).

- IL-4

La IL-4 se ha encontrado actividad inmunológica desde dos funciones principalmente, la primera es ser el principal estímulo de producción de anticuerpos IgE, la cual se da por ser el estímulo del cambio de la clase de la cadena pesada de la Inmunoglobulina de los linfocitos B al isotipo IgE y la segunda hace relación a la diferenciación y desarrollo de linfocitos Th2 a partir de linfocitos CD4 que además se presenta como factor de crecimiento para los linfocitos Th2 diferenciados, de esta forma presenta características antiinflamatorias y citoprotectoras, las cuales en diferentes estudios han planteado su relación y posibilidad de uso terapéutico en el manejo de alergias y patologías degenerativas neurológicas (18,19). Es principalmente sintetizada por linfocitos T CD4 y mastocitos, su tamaño se encuentra alrededor de 18.000 Daltons.

- IL-5

La principal función de la IL-5 es realizar la estimulación para la proliferación, migración y activación de eosinófilos, además de actuar en la interacción de linfocitos T y la inflamación eosinófilica (9). Esta es sintetizada por linfocitos CD4 y por mastocitos activados, su tamaño oscila entre los 45.000 y 50.000 Daltons. Su receptor denominado IL-5R α es de alta afinidad para realizar la actividad celular, por medio de transcripción de señales. Se ha logrado identificar a la IL-5 y a IL-5R α como importantes agentes de

trastornos patológicos eosinófilicos, tales como el asma y las patologías inflamatorias gastrointestinales eosinófilicas (20).

- IFN- γ

Esta citoquina se le ha descrito como principal función, en general, la activación de macrófagos, además, presenta funciones fundamentales frente a la respuesta inmunitaria contra microorganismos intracelulares, esta es principalmente producida por linfocitos T dentro de los que se destacan Th1 y CD8, además de linfocitos NK, su estructura es un homodímero de dos unidades una de 21.000 Daltons y otra de 24.000 Daltons, sus receptores celulares son IFN γ R1 y IFN γ R2 los cuales pueden inducir diferentes genes de activación de IFN- γ así como otros tipos de moléculas que participan en procesos de inmunidad adaptativa (9,21).

Siendo una citoquina importante en inmunidad adaptativa su principal papel se encuentra dentro de los mecanismos de defensa frente a microorganismos intracelulares presentando 4 acciones biológicas definidas.

- I. Activación de macrófagos para la destrucción de microorganismos fagocitados.
- II. Diferenciación de linfocitos T CD4, a linaje Th1 creando inhibición de proliferación a Th2.
- III. Inducción de linfocitos B a facilitar clases de IgG, principalmente IgG2a e inhibiendo el cambio a los isotipos dependientes de IL-4, como IgE e IgG1, todo esto en ratones, lo cual favorece la fagocitosis de microorganismos opsonizados.
- IV. Estimulación de múltiples moléculas que estimulan la síntesis de variadas proteínas que participan en el procesamiento de antígenos, lo cual amplifica la fase de reconocimiento de la respuesta inmunitaria adaptativa, así como activador de las células endoteliales vasculares, potencializando el TNF sobre estas células, induciendo la extravasación a los focos infecciosos (9,21).

En la clínica se ha identificado un importante papel para IFN- γ principalmente en alergias, trasplantes de órganos o trasplantes celulares, y autoinmunidad especialmente en encefalomiелitis alérgica autoinmune experimental y glomerulonefritis (21).

3.2 *Echinacea Angustifolia*

3.2.1 Generalidades

La *Echinacea* sp, es una planta clasificada taxonómicamente dentro de la familia de las compuestas (asteráceas), es originaria del centro y este de Norte América, pero también se ha encontrado cultivada en Europa, con alto uso dentro de las comunidades indígenas norteamericanas, las cuales por sus múltiples observaciones, la usan por relacionarse con actividad antiinflamatoria e inmunoestimulante, siendo su uso principal en el tratamiento de patología infecciosa de origen viral, primordialmente de las vías respiratorias superiores, tales como: resfriado común, bronquitis e inflamación de boca y faringe (22).

Desde la práctica farmacológica médica, son usadas tres especies de *Echinacea* sp, las cuales son *E. pallida*, *E. purpurea* y *E angustifolia*, siendo su composición química muy similar, aunque se les ha logrado evidenciar algunas propiedades distintas a cada una de ellas, en adicción, el análisis de la composición química realizado sobre múltiples géneros de *Echinacea* sp han mostrado una estructura química extremadamente compleja donde se incluyen derivados del ácido cafeico, alcanidas, poliacetilenos, polienos, polisacáridos y glicoproteínas, dando en conjunto una unidad química integral, de la cual se genera como hipótesis sus efectos farmacológicos (23).

3.2.2 *Echinacea angustifolia* e inmunología.

La evidencia muestra que hay existencia de actividad inmunomoduladora in vivo e in vitro de extractos de *Echinacea* sp, a los cuales se les han determinado 2 compuesto activos biológicamente, estos son conjugados del ácido cafeico y alquilaminas, estos trabajan a través de mecanismos inmunológicos específicos, entre los cuales existen algunas evidencias de actividad biológica sobre el NFκB, que es un factor de transcripción nuclear, que estimula la expresión de múltiples genes, a estos se les ha observado capacidad de respuesta inflamatoria tales como expresión de TNFα, IL-1, quimioquinas, moléculas de adhesión y ciclooxygenasa 2 (24).

Otras evidencias reportadas en estudios in vitro o en animales refieren a las alcalaminas polinsaturadas de la *Echinacea angustifolia* generan inhibición de la actividad ciclooxigenasa microsomal y de la 5-lipoxigenasa leucocitaria, sugiriendo un efecto antiinflamatorio, los polisacáridos purificados en cultivos celulares o en inyección intraperitoneal en ratones, evidencian incremento de la fagocitosis, quimiotaxis con consumo oxidativo en neutrófilos y macrófagos, sumado a esto se ha encontrado que macrófagos peritoneales produjeron aumento de TNF, IL-1, IL-6, e IL-10, las cuales son citoquinas útiles para la muerte celular en tumores, y en ex vivo se ha identificado que la *Echinacea* sp. aumenta la quimiotaxis de neutrófilos y actividad bactericida frente estafilococos (25).

3.3 Homeopatía

La homeopatía se creó bajo la concepción de las ideas del médico alemán Christian Friedrich Samuel Hahnemann que nace en 1755 y fallece en 1843, que posterior a sus investigaciones, recopiló su conocimiento en múltiples textos, referenciándose con mayor frecuencia principalmente dos de sus obras, las cuales son “Organon” desarrollado en 1810 y “Materia Medica Pura” en 1811 (26).

Es así que se postula, un esquema terapéutico que se fundamenta de primera mano en un principio axiomático denominado “Similia similibus curentur”, que en síntesis refiere, que los síntomas patológicos que agrupados se denominaran enfermedades, serán curados con remedios que producen efectos sintomáticos semejantes en individuos considerados como pacientes sanos, además en dichas observaciones identifica que los remedios presentaban un efecto dinámico el cual se aumenta, si a los mismo se les somete a un riguroso procedimiento de dilución escalonada, además, que en cada paso sea agitado y golpeado vigorosamente, conociéndose este proceso como dinamización, se creara un medicamento homeopático. Con el conocimiento de los síntomas generados del medicamento homeopáticos, comparando estos con los síntomas presentados por el paciente en la totalidad de sus síntomas define de forma amplia y segura la elección del remedio que será prescrito(27).

En este orden de ideas, no solo se crea un esquema terapéutico sino todo un sistema integral médico, un sistema médico complejo, donde la integralidad del médico es

fundamental como se encuentra plasmado en los siguientes párrafos del “Organon de la medicina”, los cuales dicen así: párrafo 1 “*La única y elevada misión del médico es la de restablecer la salud en los enfermos, que es lo que se llama curar*” y el párrafo 2 “*El ideal más elevado de una curación es restablecer la salud de manera rápida, suave y permanente, o quitar y destruir la enfermedad por el camino más corto, más seguro y menos perjudicial, basándose en principios de fácil comprensión*” (28).

De esta forma es primordial aclarar que la definición estricta de homeopatía no radica solo en el principio de similitud o en el concepto ambiguo de medicamentos diluidos y dinamizados, sino en términos más profundos que interactúan simultáneamente como lo es la ley de la naturaleza, la experimentación pura basada en la materia médica, el comportamiento de la fuerza vital, los cuales son elementos indispensables para la formulación y el estudio del paciente en la homeopatía, sumado el concepto de individualidad, genera la idea de una visión integral del individuo, por lo cual la relación salud y enfermedad del paciente, no es únicamente evaluada desde la esfera física, sino también va sobre el entendimiento de los elementos, de la esfera mental y emocional, por esto algunos autores definen la homeopatía como un resultado dinámico de la interacción entre principios vitales (29).

3.3.1 Doctrina homeopática

Para una comprensión profunda e integral de la homeopatía es fundamental entender de forma minuciosa la doctrina homeopática, en la cual se definen los conceptos de las leyes homeopáticas que son los pilares que comprenden esta ciencia médica.

Dentro de las diferentes agremiaciones científicas médicas homeopáticas, como son los consejos, asociaciones médicas y ligas internacionales se han definido los siguientes principios los cuales rigen las bases filosóficas de la homeopatía y explican la estructuración de su función, estas son:

- Vitalismo – energía vital.
- Ley de la individualidad.
- Experimentación pura.
- Dosis mínima.
- Acción reacción.

- Ley de la curación
- Ley de la Semejanza – similitud
- Remedio único.
- Miasma.

Es de esta forma que dichos principios se interrelacionan y deben ser comprendidos para conocer la doctrina homeopática y sus objetivos desde la terapéutica.

En esa vía se comprende que el vitalismo hace relación al concepto que los seres vivos comprendidos por su cuerpo material, son liderados por un elemento inmaterial que los anima, lo cual en esa dualidad de organismo y energía vital dan el concepto de vitalismo, dado lo anterior la relación salud y enfermedad, es gobernada por esa energía vital; en esta vía se entiende que cada ser vivo es integral y único, por lo cual su forma de enfermar y curar es absolutamente individual, este es el fondo del principio, entonces se deben conocer todos los elementos de cada persona, y en los cuales cada uno de sus síntomas son la expresión de la disfunción de su equilibrio de salud y enfermedad (29).

De esta misma forma, y con las bases filosóficas del vitalismo y la individualidad, los principios terapéuticos son formados por los elementos de la experimentación pura, la dosis mínima y la acción reacción, en donde la experimentación pura hace referencia que cada medicamento debe ser analizado en sus síntomas en pacientes sanos, lo cual define los síntomas y las características de los mismos para la formulación de dicha sustancia puesto que de esta forma es que cada sustancia es comprendida en homeopatía, y desde este punto de partida, con el principio de individualidad y semejanza los medicamentos homeopáticos son formulados, con relación a la dosis mínima en la cual, las observaciones de Hahnemann, la capacidad de dispersar los efectos tóxicos de las sustancias activas de los medicamentos, además de activar sus capacidades curativas, es por medio de un proceso de dinamización y dilución, los cuales son los requerimientos para la preparación de un medicamento homeopático, que llevan a esta a la disminución de las sustancia ponderal pero motivando las capacidad curativas de cada principio del medicamento homeopático en preparación, y por último se debe definir la ley de acción y reacción la que se define como el efecto que ejerce un medicamento sobre el individuo y que debido a esta acción se genera una reacción por

parte cada ser que busca equilibrar la tendencia mórbida que se encuentra en pacientes enfermos (29,30).

Con los conceptos anteriores se entiende que el equilibrio entre salud y enfermedad tiene una vía direccionada a tener tendencia hacia la salud, por lo cual se habla de ley de la curación o del orden, definida posterior a las observaciones clínicas, la forma como desde la naturaleza de las condiciones patológicas se curan de forma natural y que de esa forma se debe presentar, desde la terapéutica, dichos procesos naturales de curación y en la cual de forma sintetizada se podría decir que va desde el centro hacia la periferia, de arriba hacia abajo, en sentido inverso a como aparecieron los síntomas en las enfermedades crónicas y en el mismo sentido en que aparecieron en los episodios agudos o en las regresiones sintomáticas (30).

Sumado a esto, aparece la ley de la semejanza o similitud, la cual debe ser analizada bajo dos conceptos el primero se relaciona con que cualquier sustancia que pueda producir una totalidad de síntomas en un ser humano sano puede curar esta totalidad de síntomas en un ser humano enfermo, y como segundo concepto se refiere a que si tenemos una afección que expresa una serie de síntomas, esta será vencida permanentemente por aquella afección que se presente en el individuo de forma simulada por los medicamentos homeopáticos, puesto que esta será más fuerte que aquella que aparecen el paciente (30).

De forma final, el principio del remedio único y el concepto de miasma son descritos por la doctrina homeopática de la siguiente forma, bajo el concepto de individualidad, se condensa la posibilidad de prescribir un medicamento individual, la posibilidad de múltiples formulaciones no es toda en cuenta, debido a lo referenciado al concepto de individualidad, además de también tener relación con su diagnóstico medicamentoso, entonces se debe saber interpretar la totalidad sintomática, para inferir de forma certera en aquel remedio que cubre los síntomas del paciente y cumpla de forma cabal también la ley de la semejanza, en esta misma vía, por el análisis clínico realizado por Hahnemann, se inicia a discutir sobre el término de miasma el cual también es considerado como un principio para la homeopatía y este es definido, como una condición patológica, de características endémicas, que para la época de Hahnemann podrían inferir en elementos infecciosos, que además se observaba como crónico, las

cuales se representan en tres grupos: la psora, la sycosis y la syphilis, cada una de ellas con características muy definidas (30).

4. Materiales y Métodos

4.1 Metodología

La metodología realizada en el presente estudio fue la siguiente.

4.1.1 Tipo de estudio

Experimental, piloto, descriptivo.

4.1.2 Población y muestra

Se tomaron 10 muestras obtenidas por venopunción en adultos con previa valoración médica clínica, con impresión diagnóstica de buen estado de salud, voluntarios, única toma y un volumen máximo de 5 ml, fue criterio de exclusión estado de embarazo, se realizó procedimiento previo consentimiento informado (ANEXO 1).

4.1.3 Identificación de variables

Las variables analizadas fueron porcentaje de viabilidad de células mononucleares y expresión de IL-2, IL-4, IL-5 y IFN- γ , como citoquinas de inmunidad adaptativa, bajo la exposición con Echinacea angustifolia preparada según estándares de farmacopea homeopática alemana a la potencia de 30 CH.

4.1.4 Recolección, procesamiento y análisis de información

Como mecanismos de recolección, procesamiento y análisis de información, se tomaron los siguientes lineamientos.

- Plan de recolección.

Se tomaron diez (10) muestras de sangre periférica en tubo al vacío heparinizado, de individuos voluntarios evaluados como sanos, que no presentaban cuadros compatibles a infección activa, ya sea de origen viral o bacteriano, los cuales firmaron el formulario de consentimiento informado del presente estudio (Anexo 1), previa indicación y explicación, de los lineamientos de la investigación.

- Procesamiento.

Los estándares para el procesamiento de los diferentes elementos del proyecto de investigación se cuentan los siguientes.

Preparación homeopática.

La realización del medicamento homeopático se efectuó de acuerdo al siguiente procedimiento:

Nombre: *Echinacea angustifolia*.

Farmacopea: Farmacopea Homeopática Alemana.

Métodos de preparación de productos medicinales homeopáticos.

Método 3a: Tintura madre y diluciones líquidas.

La primera D1 se hace a partir de 3 partes (volúmenes) de Tintura madre y 7 partes (volúmenes) de alcohol al 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 al 62% (p/p).

Las diluciones siguientes se producen subsecuentemente. Emplear alcohol al 43% (p/p) para elaborar las diluciones desde la D4 en adelante (30).

La tintura madre y la realización del medicamento homeopático a la potencia 30 CH, fueron realizadas por el Laboratorio Homeopático Alemán, el cual certifica la tintura madre y el control estricto de la aplicación de la metodología en su preparación, por

medio de certificados de gestión de calidad y buenas prácticas de manufactura en medicamentos homeopáticos (BPM-H), además de análisis de estudios fisicoquímicos de del producto terminado (Anexo 2, 3, 4).

Obtención de las células mononucleares de sangre periférica

Con el debido consentimiento informado se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos mediante gradientes de densidad con Ficoll-Hipaque 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.

Evaluación de la viabilidad celular con MTT

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción, el formazan queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.

Para evaluar el efecto de la *Echinacea angustifolia* 30 CH, las células mononucleares de sangre periférica obtenidas fueron utilizadas para los experimentos inmediatamente después de ser aisladas y fueron mantenidas a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂ en el medio de cultivo celular RPMI suplementado con 10% de suero del mismo paciente, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina estreptomina. La evaluación de la toxicidad se realizó en cajas de cultivo de 96 pozos en los cuales se sembraron 1x10⁵ células por pozo contenidas en un volumen total de 150µl. Las células se sembraron por

triplicado, para cada dilución de compuesto y se utilizaron 6 pozos sin adición del compuesto o pozos control. El tratamiento con el compuesto se llevó a cabo adicionando 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14µl de la dilución 30CH por triplicado.

El efecto de *Echinacea angustifolia* se evaluó a las 48 horas por el método colorimétrico de MTT. Para esto, una vez cumplido el tiempo del tratamiento, 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 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 formados por la células vivas fueron disueltos adicionando a los pozos de cultivo 100µl de dimetil-sulfóxido DMSO e incubados 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 expresan 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 utilizadas y el porcentaje de reducción o aumento del crecimiento celular correspondiente. A partir de ello se calculó la dilución que produjo la reducción de la viabilidad celular en un 50 %.

- Cuantificación de citoquinas.

La cuantificación de citoquinas se realizó por medio de técnica de ELISA con kit de análisis de casa matriz Invitrogen®, de la cual se utilizó referencia Human Cytokine 10 Plex Panel (código catalogo no LHC0001 16 abril 2010) diseñando para la determinación cuantitativa simultanea de GM-CSF, IL 1β, IL 2, IL 4, IL 5, IL 6, IL 8, IL 10, IFN γ, y TNF α en suero, plasma y sobrenadante de tejido celular humano, con análisis por medio de equipo LUMINEX 200.

- Plan de análisis.

Para la adecuada realización de conclusiones, los datos fueron manejados de la siguiente manera.

Análisis estadístico:

Con el objetivo de evidenciar las diferencias entre la medición de las citoquinas objetivo y la exposición a *Echinacea angustifolia* 30 CH 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

Los resultados son interpretados desde las dos etapas del procedimiento, estudio de porcentaje de viabilidad de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos expuestas a *Echinacea angustifolia* 30CH y cuantificación de niveles de citoquinas mediadoras de inmunidad adaptativa, IL 2, IL 4, IL 5 y IFN- γ .

5.1 Prueba de viabilidad de células mononucleares de sangre periférica en individuos sanos.

Las células mononucleares fueron expuestas a una preparación homeopática de *Echinacea angustifolia* a la 30 CH en volúmenes de 2 uL, 4 uL, 6 uL, 8 uL, 10 uL, 12 uL y 14 uL, en todos los volúmenes se evidenció viabilidad, demostrando integralidad mitocondrial por medio de la prueba aplicada. Se evidenció que los porcentajes de viabilidad fueron diferentes para cada tipo de volumen, encontrándose mayor respuesta a 14 uL, siendo esta la mayor concentración utilizada (Figura 1).

5.2 Cuantificación de citoquinas

Previa calibración de la prueba para medición de cada una de las citoquinas de interés (Figura 2), se reportó, por análisis estadístico R^2 cercanos a 1, evidenciándose un adecuado nivel de calibración para la realización de la cuantificación de las citoquinas de estudio.

De esta manera, se realizó análisis de expresión de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ , como resultado, en el caso, de la medición análisis de la expresión de IL 2 y IL 4 frente al control no se evidenció diferencias significativas en la proliferación que permitan concluir

que se presenten cambios de dichas citoquinas (Figura 3), por lo cual no se detecto efecto sobre la expresión de ellas frente a la exposición de la preparación homeopática usada, en este estudio.

En relación, a las citoquinas, IL-5 e IFN- γ se evidenció una marcada expresión de las citoquinas en niveles superiores a 5250 y 16200, correspondientemente para cada citoquina (Tabla 1 y 2), siendo estos los límites superiores de identificación que la prueba reporta, lo cual no permite realizar un análisis comparativo cuantitativo estadístico frente al control, debido a este resultado solo permite presentar la expresión positiva por parte de la células mononucleares, de estas citoquinas.

6. Discusión

Desde las bases de las ciencias básicas medicas, los efectos biológicos de los medicamentos homeopáticos han presentado grandes interrogantes, por medio de este estudio se trató de demostrar la actividad que la Echinacea angustifolia 30CH posee sobre la inmunidad adaptativa.

Se realizo de prueba de viabilidad celular, por medio de porcentaje de viabilidad celular, debido a los resultados se puede inferir que el medicamento homeopático Echinacea angustifolia30CH genera efectos que promueven la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional, por lo cual se concluye que este promueve la actividad celular y además carece de efectos tóxicos, como se ha podido ver en otro estudios con medicamentos homeopáticos (32), dando las primeras condiciones para determinar como seguro su uso en humanos.

Debido a la ausencia de expresión de IL-2 y IL-4, se concluye que el medicamento homeopático de estudio no posee actividad sobre las posibles vías de actividad de la inmunidad adaptativa que estas citoquinas interactúan, por lo cual plantea otras posibilidades en sus mecanismos de acción.

Dentro de la evidencia de los resultados, llama el interés de la investigación la expresión superior al rango esperado de IL-5 y IFN- γ , donde se confirma actividad con capacidad de activación de vías de la inmunidad adaptativa, por parte de la preparación, pero no se logra hacer un análisis cuantitativo estadístico que permita hacer un análisis más profundo del resultado, en contravía el hecho que todos los paciente presentaron el resultado podría generar la discusión de un posible evento aislado que debería confirmarse por medio de repetición de la prueba de forma sucesiva, en otros grupos para confirmar la hipótesis, generada sobre la respuesta de inmunidad adaptativa..

Es importante en la vía del crecimiento científico, que este estudio sea referencia para la comprensión de la actividad biológica de la homeopatía, que demuestra nuevamente los estímulos que por biología molecular poseen los medicamentos homeopáticos, evidenciándose que ciertas citoquinas encargadas de la actividad proliferativa mononuclear tiene actividad inducida por parte del medicamento homeopático estudiado y desde este punto, realizar estudios más profundos sobre los efectos de citoquinas tales como IL-5 y IFN- γ , como los resultados encontrados entre estas citoquinas y las patologías alérgicas (33).

Por último, y desde el enfoque de la comprensión de la homeopatía, genera la discusión de proponer que estas expresiones inmunológicas, de pacientes sanos, se han consideradas en futuro como signos para la repertorización de los pacientes a tratar según el principio de experimentación pura, o solo continuar con el análisis clínico individual de los pacientes.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

Por la evidencia de la respuesta frente a los volúmenes a los cuales las células fueron expuestas y debido a que se evidenció diferencia, además de encontrarse que una relación parcialmente lineal progresiva, se propone que puede haber una dependencia frente a la dosis que sea utilizada por lo cual se debe realizar un estudio más minucioso que defina la dosis de los medicamentos, además que se recomienda para posteriores estudios el análisis de dicha dosis analizado desde el principio de dosis mínima.

No se evidenció cambios en la expresión de citoquina IL-2 e IL-4 por parte de las células mononucleares, frente al control, por lo cual se concluye que estas citoquinas no se encuentran involucradas en los efectos proliferativos que se evidenciaron en los estudios de viabilidad, además de no ser modulada su respuesta por parte del medicamento de estudio.

De esa misma forma, se observó una marcada expresión de IL-5 e IFN- γ frente a la exposición de Echinacea angustifolia 30CH, la cual fue mayor a 5250 y 16200 respectivamente, que debido al ser superados los rangos de estudio de la prueba aplicada no se pudo realizar un estudio cuantitativo.

Debido a la respuesta inductora que se evidenció sobre las células mononucleares, se puede deducir que no se observa efecto tóxico a la exposición del medicamento homeopático utilizado en el presente estudio.

Se demuestra que el medicamento homeopático Echinacea angustifolia a la 30 CH presenta actividad biológica molecular sobre las células mononucleares, lo que evidencia que los medicamentos homeopáticos carentes de dosis ponderales desde el punto de

vista químico, pero que por medio de la dinamización y la dilución si tienen efectos biológicos, que el conocimiento científico actual no logra realizar un modelo aplicable para su explicación.

7.2 Recomendaciones

Desde la visión de la doctrina homeopática unicista, el principio de experimentación pura fundamenta el desarrollo de las herramientas de investigación en la homeopatía, y genera los signos y síntomas que por la metodología de repertorización y materia medica se diagnostica un medicamento frente al estado morbosos patológico de cada individuo (30), de esta forma se podrá crear nuevos signos que fundamenten desde una visión paraclínica del diagnóstico del paciente, con la comprensión de nuevos análisis de la individualización del mismo, que enriquezcan los diagnósticos que los médicos homeópatas realizan desde la doctrina homeopática del uso de paraclínicos.

Con la expresión de IL-5 e IFN- α , por parte de células mononucleares expuestas a *Echinacea angustifolia* 30 CH, se plantea un mecanismo de acción del medicamento en estudio, por lo cual sustenta su uso desde los conceptos de la inmunología, en manejo de condiciones alérgicas (9,33,34), esto debe seguir siendo un motivo de estudio en el cual nos solo estudiar la respuesta inmunológica adaptativa, sino también profundizar en los estudios de la homeopatía para el manejo patologías de hiperreactividad inmunológica.

Además, se sustenta la utilización del medicamento en humanos no encontrándose efectos tóxicos de este sobre la actividad celular expuesta en las pruebas de viabilidad, debido a que tenemos evidencia que algunos medicamentos homeopáticos han presentado efectos adversos en estudios preliminares (32).

Continuar en la comprensión de nuevos conocimientos por medio de pruebas que desde las ciencias básicas, explique en un mismo lenguaje el comportamiento de los medicamentos homeopáticos para dar solución a la discusión entre la homeopatía y la alopática.

Anexos: Consentimiento informado.

Fecha:

El Doctor Camilo Andrés Cruz Castro alumno de la maestría de medicina alternativa, área homeopatía de la Universidad Nacional de Colombia se encuentra desarrollando un proyecto de investigación con el propósito de determinar la acción del medicamento homeopático *Echinacea angustifolia* 30CH sobre células mononucleares de humanos.

Para poder efectuar el estudio es necesario obtener una muestra de sangre de donantes voluntarios, este procedimiento es llamado VENOPUNCION, que consiste en introducir una aguja estéril en una vena de sus extremidades, de preferencia en miembro superior, para realizar extracción de una muestra de sangre no superior a 5 cc. A partir de dicha muestra de sangre se obtendrán células mononucleares que serán expuestos al medicamento homeopático.

Los riesgos de realizar la venopunción a pesar de la adecuada elección técnica, son incomodidad, dolor, hematoma, mareo o náuseas transitorias, contracción muscular de la extremidad realizada y en escasas ocasiones infección de la herida del procedimiento, en caso de presentarse cualquier complicación su manejo es médico de primer nivel de atención. En la actualidad no se conoce otro tipo de técnica que permita realizar este procedimiento de forma alterna, para la toma de muestras de sangre periférica.

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.

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

Nombre del paciente _____

Firma: _____

Identificación : _____

Teléfono: _____

Dr. Camilo Andrés Cruz Castro.

Firma: _____

Identificación CC 79981360.

Testigo: _____

Firma: _____

Identificación: _____

Anexo No 2. Ficha técnica tintura madre Echinacea angustifolia.**Gehrlicher**GmbH
Pharmaceutical Extracts**Certificate of analysis**


Name of the product:	Echinacea angustifolia - Mother Tincture
Lot-No.:	U 5136
Botanical name:	Echinacea angustifolia DC.
Plant section used:	Fresh, whole plant at the flowering time
Extract medium:	Ethanol 86 % m/m according to rule 3 a HAB 2000
Appearance:	ethanolic clear solution Colour: yellowgreen Odour: aromatic Taste: sweet
Identity:	according to HAB 2000 complies „Echinacea angustifolia“ (test A - C positive)
Relative density Ph. Eur. 2002:	0,9071
pH-content Ph. Eur. 2002:	7,0
Dry residue Ph. Eur. 2002:	2,0 % m/m
Methanol/Isopropylalcohol (GC):	complies, according to Ph. Eur. 2002 ($\leq 0,05$ % V/V)
Ethanol content (GC):	65,7 % V/V = 57,9 % m/m
Spectrum UV - VIS:	documented Journal-No.: brown 341

D-82547 Eurasburg/Obb.

December 5th, 2008 - Dr.Z/B.Gehrlicher GmbH
Pharmazeutische Extrakte
az-engl/AZ-E-UR.doc

Gehrlicher GmbH, Pharmazeutische Extrakte, Robert-Koch-Str. 50/51, D-82547 Eurasburg/Obb., Telefon: 08173-8010, Telefax: 08173-978

Anexo no 3. Ficha técnica análisis físico químico tintura madre.

 Laboratorio Homeopático Aleman®	ESPECIFICACIONES Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE TINTURA MADRE O CEPA HOMEOPÁTICA		
	CÓDIGO CDC-ETM031-094	PÁGINA 1 de 2	VERSIÓN 02
Nombre científico: <i>Echinacea (Echinacea angustifolia DC.)</i>			
Presentación: Solución		Código: M3TMECHIN	
Composición: Echinacea angustifolia		Método de Fabricación: Método 3a. Vida útil: 5 años. Muestreo: Ver procedimiento código CDC-POE-057-001.	
Condiciones de almacenamiento: Mantener a una temperatura máxima de 30°C y una humedad relativa menor al 70%. Protegido de la luz solar.		Reanálisis: 12 meses después de la fecha de análisis interno.	
1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO.			
PARÁMETROS	ESPECIFICACIONES	FUENTE DE ESPECIFICACIÓN	
ASPECTO Y COLOR	La tintura madre es un líquido verde amarillento con un olor aromático y sabor dulce.	Farmacopea Homeopática Alemana. Versión 2.000	
IDENTIFICACIÓN	Debe cumplir los test de identificación A, B y C	Farmacopea Homeopática Alemana. Versión 2.000	
DENSIDAD RELATIVA	0.885 a 0.910	Farmacopea Homeopática Alemana. Versión 2.000	
RESIDUO SECO (% p/p)	No menos del 1.3%	Farmacopea Homeopática Alemana. Versión 2.000	
1.1. Identificación.			
<p>A. Calentar 1 mL de Tintura Madre con 1.5 mL de una solución R de floroglucinol. Se produce un color rojo o rojo oscuro.</p> <p>B. A 1 mL de Tintura Madre adicionar 0.1 mL de solución R1 de cloruro férrico. Se produce un color verde oliva a marrón.</p> <p>C. Cromatografía: se debe analizar por cromatografía en capa fina (H 2.2.4.) en láminas preparadas con una fina capa de sílica gel H R.</p> <p>Solución problema: agitar 10 mL de Tintura Madre con dos porciones de 10 mL de hexano R cada una. Secar las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio anhidro R y filtrar. Evaporar el filtrado hasta sequedad en un rotavapor a presión reducida y disolver el residuo en 0.5 mL de metanol R.</p>			

FIGURAS

Figura no 1. Efecto in vitro de *Echinacea angustifolia* 30 Ch homeopatizada sobre viabilidad de células mononucleares de sangre periférica a 48 horas de exposición.

Efecto in vitro de Echinacea 30CH homeopatizada sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica 48 horas de exposición

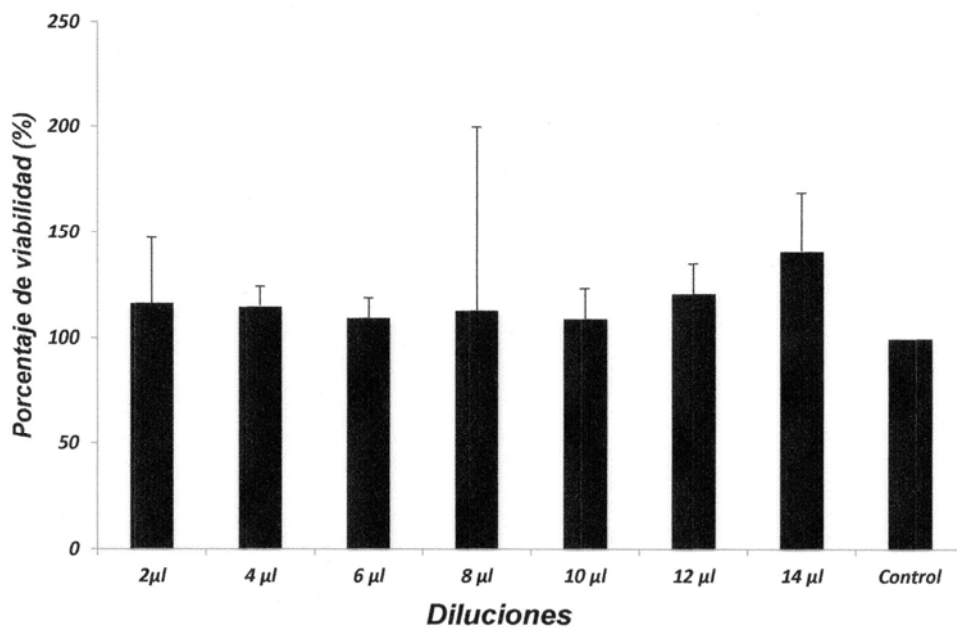


Figura No 2. Curvas de calibración para medición de citoquinas.

Curvas de calibración para medición de citoquinas.

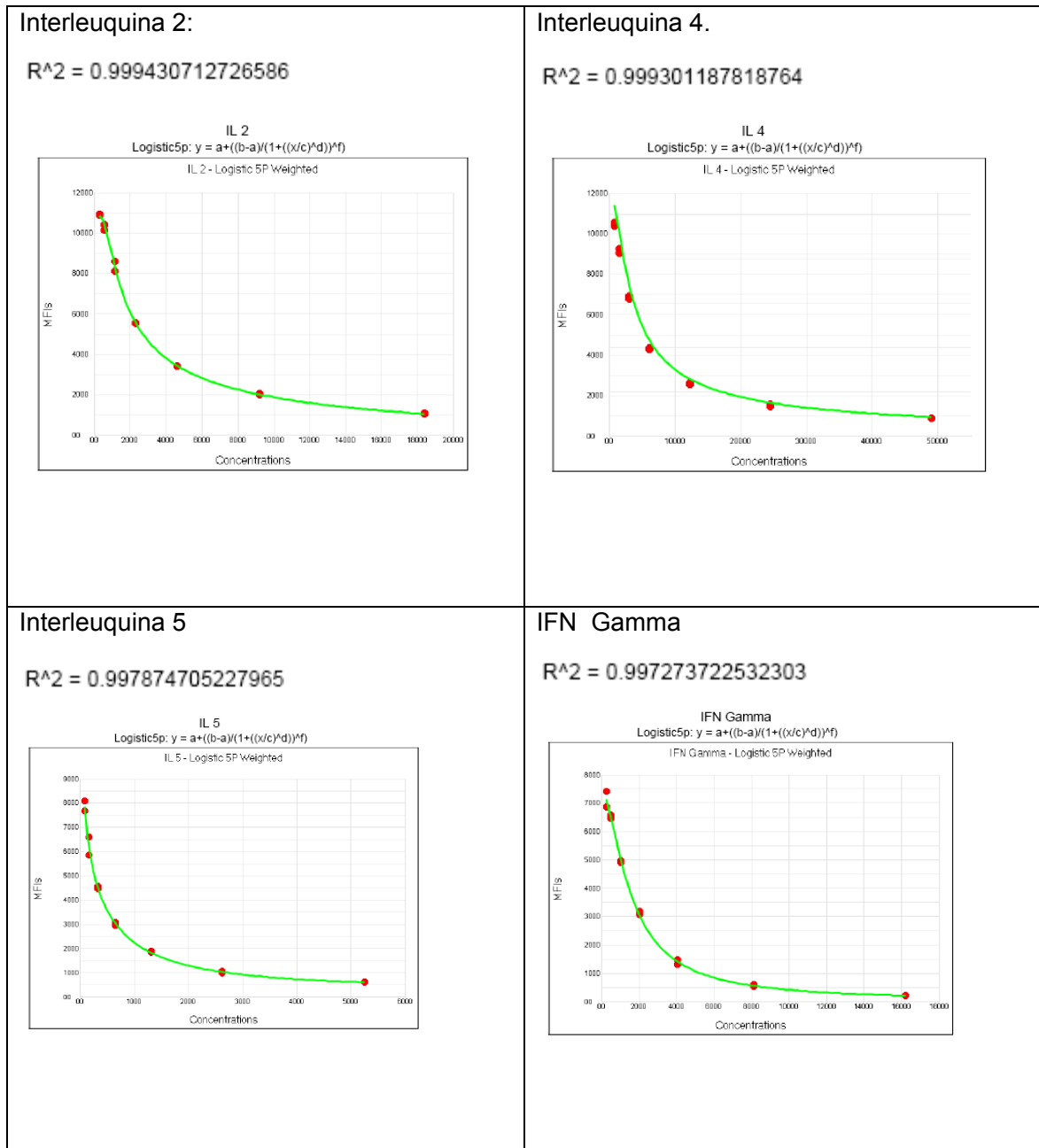


Figura No.3 Efecto in vitro de la Echinacea angustifolia 30 CH como medicamento homeopático sobre los niveles de IL - 2 y IL – 4 en células mononucleares de sangre periférica

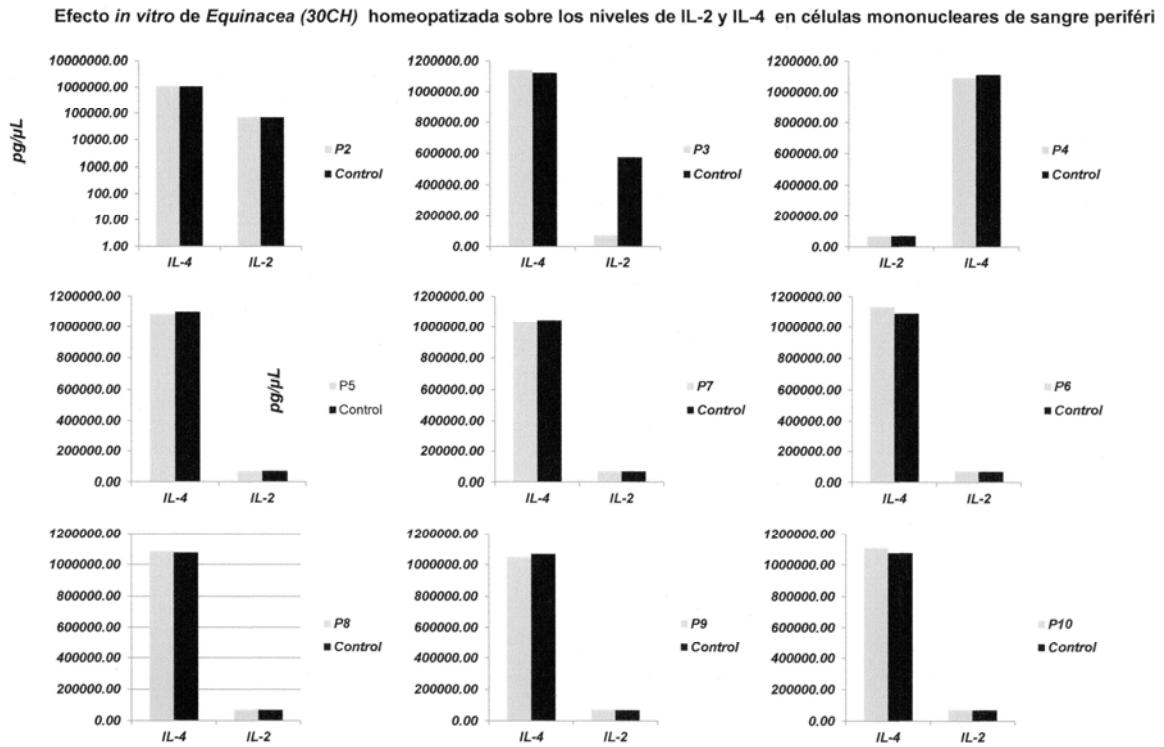


TABLA No. 1.

Tabla 1. Expresión de IFN gamma en células mononucleares expuestas a Echinacea angustifolia 30 CH

Luminex

8/4/2011 4:23:59PM

Data Interpretation Report

Batch Name: New Batch 2
 Protocol Name: Citoquinas 10 plex
 Protocol Version: 2
 Test Name: IFN Gamma

Samples:

Loc	Sample ID	Net MFI	Test Result	Range	%CV of Replicates	Unit	Dilution Factor	Comments
1,A1	Background0	0					0.00	
1,A2	Background0	0					0.00	
1,A3	Unknown1	2.5	>16200				1.00	
1,B3	Unknown2	4	>16200				1.00	
1,C3	Unknown3	2	>16200				1.00	
1,D3	Unknown4	4	>16200				1.00	
1,E3	Unknown5	4	>16200				1.00	
1,F3	Unknown6	2	>16200				1.00	
1,G3	Unknown7	5	>16200				1.00	
1,H3	Unknown8	4	>16200				1.00	
1,A4	Unknown9	2	>16200				1.00	
1,B4	Unknown10	4	>16200				1.00	
1,C4	Unknown11	2	>16200				1.00	
1,D4	Unknown12	3	>16200				1.00	
1,E4	Unknown13	4	>16200				1.00	
1,F4	Unknown14	3	>16200				1.00	
1,G4	Unknown15	4.5	>16200				1.00	
1,H4	Unknown16	4	>16200				1.00	
1,A5	Unknown17	5	>16200				1.00	
1,B5	Unknown18	3	>16200				1.00	
1,C5	Unknown19	3	>16200				1.00	
1,D5	Unknown20	2	>16200				1.00	
1,E5	Unknown21	1	>16200				1.00	
1,F5	Unknown22	2	>16200				1.00	
1,G5	Unknown23	5	>16200				1.00	
1,H5	Unknown24	2	>16200				1.00	
1,A6	Unknown25	5	>16200				1.00	

Luminex XPONENT SOFTWARE SOLUTIONS

Page 5 of 9

Tabla 2 Expresión de IL 5 en células mononucleares expuestas a Echinacea angustifolia 30 CH

Luminex

Data Interpretation Report

8/4/2011

4:24:08PM

Batch Name: New Batch 2
Protocol Name: Citoquinas 10 plex
Protocol Version: 2
Test Name: IL 5

Samples:

Loc	Sample ID	Net MFI	Test Result	Range	%CV of Replicates	Unit	Dilution Factor	Comments
1.A1	Background0	0					0.00	
1.A2	Background0	0					0.00	
1.A3	Unknown1	2	>5250				1.00	
1.B3	Unknown2	4	>5250				1.00	
1.C3	Unknown3	3	>5250				1.00	
1.D3	Unknown4	3	>5250				1.00	
1.E3	Unknown5	4	>5250				1.00	
1.F3	Unknown6	3	>5250				1.00	
1.G3	Unknown7	7	>5250				1.00	
1.H3	Unknown8	5	>5250				1.00	
1.A4	Unknown9	3	>5250				1.00	
1.B4	Unknown10	4	>5250				1.00	
1.C4	Unknown11	3	>5250				1.00	
1.D4	Unknown12	3	>5250				1.00	
1.E4	Unknown13	4	>5250				1.00	
1.F4	Unknown14	3	>5250				1.00	
1.G4	Unknown15	6	>5250				1.00	
1.H4	Unknown16	5	>5250				1.00	
1.A5	Unknown17	6	>5250				1.00	
1.B5	Unknown18	4	>5250				1.00	
1.C5	Unknown19	3	>5250				1.00	
1.D5	Unknown20	3	>5250				1.00	
1.E5	Unknown21	2	>5250				1.00	
1.F5	Unknown22	3	>5250				1.00	
1.G5	Unknown23	6	>5250				1.00	
1.H5	Unknown24	2	>5250				1.00	
1.A6	Unknown25	6	>5250				1.00	

Luminex



Bibliografía

1. Bellavite P, Conforti A, Piasere V, et al. Immunology and homeopathy 1 Historical background. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005 Dec;2(4):441-52.
2. Bellavite P, Conforti A, Piasere V, et al. Immunology and homeopathy 2. Cell of the immune system and inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006 Feb;3(1):13-24.
3. National Center For Complementary And Alternative Medicine. Herbs at a glance. Echinacea, Acceso a <http://nccam.nih.gov/health/echinacea/ataglace.htm>, Marzo 26, 2010, 16:13.
4. Bellavite P, Ortolani R, Conforti A. Immunology and Homeopathy 3. Experimental Studies on Animal Models. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006 May;3(2)171–186.
5. Glatthaar-Saalmüller B. In vitro evaluation of the antiviral effects of the homeopathic preparation Gripp-Heel on selected respiratory viruses. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007 Nov;85(11):1084-90.
6. Septimus EJ, Kuper KM. Clinical challenges in addressing resistance to antimicrobial drugs in the twenty-first century. *Clinical pharmacology & therapeutics.* 2009; 86, 3: 336-339.
7. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F. et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med* 2007 Oct 11; Vol 357(15): 1487-1495.

8. Ramachandran C, Nair C, Clement RT. Et al. investigation of cytokine expression in human leukocyte cultures with two immune-modulatory homeopathic preparations, J Alt and Com Med, 2007 13(4):403-407.
9. Abbas A., Lichtman A., Pillai S. Inmunología celular y molecular. Sexta Edición. Elsevier Saunders, España 2008. ISBN 978-84-8086-311-7.
10. Enbergs H. Effects of the homeopathic preparation Engystol on interferon-gamma production by human T-lymphocytes. Immunol Invest. 2006;35(1):19-27.
11. Barak V, Birkenfeld S, Halperin T, Et al. The effect of herbal remedies on the production of human inflammatory and anti-inflammatory cytokines. IMAJ, 2002 4: 919-922
12. Pillai S., Pillai C. Mitscher LA, Et al. Use of quantitative flow cytometry to measure ex vivo immunostimulant activity of Echinacea: the case for polysaccharides. J Alt and Com Med, 2007 13(6):625-634.
13. Perlman A, Stagnaro-Green A. Developing a complementary, alternative, and integrative medicine course: one medical school's experience. J Altern Complement Med, ISSN: 1557-7708, 2010 May; Vol. 16 (5), pp. 601-5; PMID: 20455785.
14. Linde K, Barrett B, Bauer R, Melchart D, Woelkart K. Echinacea for preventing and treating the common cold. Cochrane Database of Systematic Reviews 2006, Issue 1. Art. No.: CD000530. DOI:10.1002/14651858.CD000530.pub2.
15. Zidek Z, Anzenbacher P, Kmonickova E. Current status and challenges of cytokine pharmacology. British journal of pharmacology, [Br J. Pharmacol], ISSN 0007-1188/09,157pp.342-361;doi:10.1111/j.1476 5381.2009.0206.x; publicado online 3 abril 2009.

16. Jaqueti Aroca J, Gómez de Terreros Sánchez F. Adenosina desaminasa y receptores solubles de interleuquina 2 en el sida. Ed Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 2005.
17. Pett SL, Kelleher AD, Emery S. Role of Interleukin-2 in Patients with HIV infection. *Drugs*. 2010 Jun 18;70(9):1115-30. doi: 10.2165/10898620-000000000-00000. Review. PMID:20518579.
18. Isidoro-García M, Dávila I, Laffond E, Moreno E, Lorente F, González-Sarmiento R, Interleukin-4 (IL4) and Interleukin-4 receptor (IL4RA) polymorphisms in asthma: a case control study. *Clinical And Molecular Allergy: CMA [Clin Mol Allergy]*, ISSN: 1476-7961, 2005 Nov 29; Vol. 3, pp. 15; PMID: 16313681.
19. Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR, Appel SH. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *Journal Of Neurochemistry [J Neurochem]*, ISSN: 0022-3042, 2006 Nov; Vol. 99 (4), pp. 1176-87; PMID: 17018025.
20. Ishino T, Harrington AE, Gopi H, Chaiken I. Structure-based rationale for interleukin 5 receptor antagonism. *Current Pharmaceutical Design [Curr Pharm Des]*, ISSN: 1873-4286, 2008; Vol. 14 (12), pp. 1231-9; PMID: 18473871
21. Wei B, Baker S, Wieckiewicz J, Wood KJ. IFN-gamma triggered STAT1-PKB/AKT signalling pathway influences the function of alloantigen reactive regulatory T cells. *American Journal Of Transplantation: Official Journal Of The American Society Of Transplantation And The American Society Of Transplant Surgeons [Am J Transplant]*, ISSN: 1600-6143, 2010 Jan; Vol. 10 (1), pp. 69-80; PMID: 19889125.
22. Jouanny J, Demarque D, Poitevin B. *Farmacología y materia medica homeopática*. Primera Edición. BOIRON S.I.H, España 1997. Pág. 184 I.S.B.N 84-923384-0-7.
23. Chicca A, Pellati F, Adinolfi B, Et al. Cytotoxic activity of polyacetylenes and polyenes isolated from roots of *Echinacea pallida*. *British Journal Of Pharmacology [Br J Pharmacol]*, ISSN: 0007-1188, 2008 Mar; Vol. 153 (5), pp. 879-85; PMID: 18193076.

24. Matthias A, Banbury L, Stevenson LM, Et al. Alkylamides from echinacea modulate induced immune responses in macrophages. Immunological Investigations [Immunol Invest], ISSN: 0882-0139, 2007; Vol. 36 (2), pp. 117-30; PMID: 17365014.
25. Percival S. Use of Echinacea in Medicine. Biochemical Pharmacology, ISSN 0006-2952/00/\$-see front matter, vol. 60, pp 155-158, 2000. PII S 0006-2952(99)00413-X
26. SKYLARKBOOKS. Biblioteca [en línea].
<http://www.skylarkbooks.co.uk/Hahnemann_Biography.htm>[citado en 27 de enero de 2012].
27. Leon A. La doctrina homeopática y la práctica de la homeopatía. Gaceta Medica de Caracas [Gac Med Caracas]. 2000; 108(3): 306-307.
28. Hahnemann S. Organon de la medicina. Traducido al castellano de la sexta edición alemana revisada por su autor. B. Jain Publishers(P)Ltd, Nueva Deli 2008. Pag 85. ISBN: 978-81-319-0381-0.
29. Adler U C, Ambrosio E, Anelli I M, Et al. A strict definition of homoeopathy according to Hahnemann. British Homoeopathic Journal, ISSN: 1475-4916, 1996 April; Vol. 85, pp 79-82.
30. Barrios J, Bayona M, Correa F, et al. Doctrina homeopática. Primera Edición. Fundación Instituto Colombiano de homeopatía Luis G. Páez, Colombia 2005. ISBN 958-33-7995-6.
31. Driehsen W, Flachsbarth H, Cardyan H, Et al. German Homeopathic Pharmacopoeia. Medpharm Scientific Publishers. 5edición 2003. ISBN:978-3887630959.
32. Banerjee A, Pathak S, Biswas J, et al. Chelidonium majus 30C and 200C in induced hepato-toxicity in rats. Homeopathy, Volumen 99, Issue 3, Jul 2010, Pag 167-176

-
33. Carol A. Wu, John J. Peluso, Li Zhu, et al. Bronchial epithelial cells produce IL-5: Implications for local immune responses in the airways. *Cellular Immunology*, Volume 264, Issue 1, 2010, Pag 32-41.

 34. Elio Rossi, Paola Bartoli, Alba Bianchi, et al. Homeopathy in paediatric atopic diseases: long-term results in children with atopic dermatitis. *Homeopathy*, Volumen 101, Issue 1, Ene 2012, Pag 13-20.