

**EXPLORACIÓN DEL EFECTO DE ALTAS DILUCIONES SUCUSIONADAS
(MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO) DE *Phytolacca americana* SOBRE
LINFOCITOS HUMANOS. FASE 2**

RENNE LEONARDO HERNANDEZ NIÑO

CODIGO 598314

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA EN MEDICINA ALTERNATIVA – HOMEOPATIA

BOGOTA

2010

**EXPLORACIÓN DEL EFECTO DE ALTAS DILUCIONES SUCUSIONADAS
(MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO) DE *Phytolacca americana* SOBRE
LINFOCITOS HUMANOS. FASE 2**

RENNE LEONARDO HERNANDEZ NIÑO

CODIGO 598314

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

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

**Codirector: Dr. Germán Darío Benítez Cárdenas. Mg. Medicina Alternativa
– Homeopatía. Universidad Nacional de Colombia.**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA EN MEDICINA ALTERNATIVA – HOMEOPATIA

BOGOTA

2010

TITULO EN ESPAÑOL: Exploración del efecto de altas diluciones sucusionadas (Medicamento homeopático) de *Phytolacca americana* sobre linfocitos humanos. Fase 2

TITULO EN INGLES: Research on the effect of high succussioned dilutions (Homeopathic medicament) of *Phytolacca Americana* on Human lymphocytes. Phase 2.

RESUMEN EN ESPAÑOL: INTRODUCCION: La investigación en homeopatía desde las ciencias básicas está permitiendo dar explicación desde la evidencia científica a los hallazgos encontrados en la clínica. A partir de un caso clínico de un paciente con enfermedad de Rossai Dorfman tratado con el medicamento homeopático *Phytolacca americana*, se busca explorar el efecto del extracto de la planta *Phytolacca americana* en altas diluciones sucusionadas sobre poblaciones de linfocitos T in vitro. **MATERIALES Y METODOS:** Ensayo experimental en el que se cultivan mononucleares de sangre periférica de 12 donantes sanos, y se exponen a tres dinamizaciones de *Phytolacca americana* 6CH, 15CH y 30CH y a una dilución 6CH no sucusionada, posteriormente se mide la linfoproliferación de las células y se cuantifican las citoquinas del perfil Th1 y Th2. Los hallazgos se analizan mediante test paramétrico pareado. **RESULTADOS:** Los resultados obtenidos muestran que las dinamizaciones 6CH, 15CH y 30CH presentaron actividad linfoproliferativa ($p < 0,05$); además se encontró una diferencia significativa muy importante entre la dinamización 6CH y la dilución 6CH sin sucusionar en la cual no se presentó actividad mitogénica ($p < 0,05$). En la cuantificación de citoquinas hay una inmunosupresión selectiva en la liberación de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleuquina (IL)10 e IL6 con respecto al nivel basal. ($p < 0,05$). **CONCLUSIONES:** *Phytolacca americana* en dinamizaciones 6CH, 15CH y 30CH poseen acción mitogénica sobre linfocitos T in vitro; es de fundamental importancia la sucución en la preparación del medicamento para generar tal efecto biológico. Las diferentes dinamizaciones producen un estímulo inmunosupresor selectivo sobre linfocitos T en la liberación de TNF- α , IL10 e IL6 in vitro.

TRADUCCION DEL RESUMEN AL INGLES: INTRODUCTION: The investigation on homeopathy from basics sciences is allowing to give explanation from scientific evidence to the discoveries found in the clinic. From a clinical case of a patient with

the Rossai Dorfman disease treated with the homeopathic medicament *Phytolacca americana*, it is sought to explore the effect of the extract of the *Phytolacca Americana* plant in high dilutions, succussioned on in vitro T lymphocytes samples. **MATERIALS AND METHODS:** Experimental test in which there are cultivated mononuclears of peripheral blood from twelve healthy donors, and then exposed to three dynamizations of *Phytolacca americana* 6CH, 15CH, 30CH, and to a non-succussioned 6CH dilution. Subsequently the lymphoproliferation of the cells is measured and then quantified the cytokines of Th1 and Th2 profile. The findings are analyzed by means of a parametrical paired test. **RESULTS:** The results obtained show that the dynamizations 6CH, 15CH and 30CH presented lymphoproliferative activity ($p < 0,05$); furthermore it was found an important significant difference between the dynamization 6HC and the non-succussioned 6HC dilution which did not present mitogenetic activity ($p < 0,05$). In the quantification of the cytokines there is a selective immunosuppression in the releasing of Tumoral Necrosis Alpha Factor (TNF- α), interleukin (IL) 10 and IL6 regarding the basal level. **CONCLUSIONS:** *Phytolacca americana* in dynamizations 6CH, 15CH and 30CH present mitogenetic activity on in vitro T lymphocytes; it is mainly important the succussion in the preparation of the medicament to generate such biological effect. The different dynamizations produce an immunosuppressive stimulus on T lymphocytes in the releasing of TNF - α , IL10 and in vitro IL6.

PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL: *Phytolacca americana*, dinamizaciones homeopáticas, citoquinas, linfoproliferación.

PALABRAS CLAVE EN INGLES: *Phytolacca americana*, homeopathic dynamization, cytokines, lymphoproliferation

FIRMA DEL DIRECTOR: _____

RENNE LEONARDO HERNANDEZ NIÑO 1977

***A todos aquellos seres
que dedican su tiempo a la
ciencia y al servicio.***

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	12
2. JUSTIFICACION	15
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
4. MARCO TEORICO	19
4.1 ANTECEDENTES EN INVESTIGACION EN HOMEOPATIA	19
4.2 <i>Phytolacca americana</i>	25
4.2.1 Composición de <i>Phytolacca americana</i>	25
4.2.2 Antecedentes de investigación con <i>Phytolacca americana</i>	26
4.2.3 Experimentación patogenética de <i>Phytolacca americana</i>	27
4.3 ENFERMEDAD DE ROSAI-DORFMAN	28
4.4 LINFOCITOS T Y B	30
4.5 CITOQUINAS	31
4.5.1 Clases de Citoquinas	32
4.6 PREPARACIONES HOMEOPATICAS	34
5. MATERIALES Y METODOS	36
5.1 PREPARACION DE FORMULACIONES HOMEOPATICAS DE <i>Phytolacca americana</i>	36
5.2 CULTIVO CELULAR	37
5.3 AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA (PBMCS)	37
5.4 ENSAYO DE LINFOPROLIFERACION	38
5.5 CUANTIFICACION DE CITOQUINAS DEL PERFIL TH1-TH2	38
5.6 ANALISIS ESTADISTICO	39
6. RESULTADOS	40
6.1 RESPUESTA DE MONONUCLEARES A ESTIMULO MITOGENICO	40
6.2 RESPUESTA MITOGENICA DE MONONUCLEARES FRENTE A DINAMIZACIONES DE <i>Phytolacca americana</i>	40
6.3 RESPUESTA MITOGENICA DE <i>Phytolacca americana</i> DEPENDIENTE DEL EFECTO DE LA SUCUCION	41
6.4 CUANTIFICACION DE CITOQUINAS FRENTE A LA EXPOSICION DE <i>Phytolacca americana</i> EN DIFERENTES DINAMIZACIONES	41

7.	DISCUSION	42
8.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	51
9.	REFERENCIAS	52
	ANEXOS	60

LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo 1. Consentimiento informado	60

LISTA DE FIGURAS

	Pág
FIGURA 1. Niveles de citoquinas pro y anti-inflamatorias cuantificadas en los sobrenadantes de cultivo de las células expuestas a Pokeweed.	62
FIGURA 2. Respuesta de células mononucleares humanas frente al estímulo a ultra altas diluciones de <i>Phytolacca americana</i> .	63
FIGURA 3. Respuesta de células mononucleares humanas frente a la exposición a ultra altas diluciones de <i>Phytolacca americana</i> sucusionadas y sin sucusionar.	63
FIGURA 4. Niveles de citoquinas pro y anti-inflamatorias cuantificadas en los sobrenadantes de cultivo de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) expuestos a ultra altas diluciones de <i>Phytolacca americana</i> .	64

LISTA DE TABLAS

	Pág
TABLA No. 1 Respuesta mitogénica de mononucleares frente a dinimizaciones de <i>Phytolacca americana</i>	65
TABLA No. 2 Análisis Estadístico de la Respuesta mitogénica de mononucleares frente a dinimizaciones de <i>Phytolacca americana</i>	65
TABLA No. 3 Análisis estadístico de la Cuantificación de citoquinas (IFN- γ , IL2 e IL4) frente a la exposición de <i>Phytolacca americana</i> en diferentes dinimizaciones	66
TABLA No. 4 Analisis estadístico de la Cuantificación de citoquinas (TNF- α , IL6 e IL10) frente a la exposición de <i>Phytolacca americana</i> en diferentes dinimizaciones	66

LISTA DE SIGLAS

CH:	Centesimal Hahnemanniana
Ig:	Inmunoglobulina
IL 2:	Interleuquina 2
IL 10:	Interleuquina 10
IL 6:	Interleuquina 6
IFN- γ :	Interferón gama
NK:	Natural Killer
TNF α :	Factor de Necrosis Tumoral alfa.
Th1:	Linfocitos T Helper 1
Th2:	Linfocitos T Helper 2
TM:	Tintura Madre

1. INTRODUCCION

Hipócrates, padre de la medicina moderna, describió dos vías básicas para tratar la enfermedad, enunciando dos postulados terapéuticos fundamentales: la ley de la curación por los semejantes y la ley de la curación por los opuestos (1). El médico alemán Samuel Hahnemann asignó el nombre de Homeopatía a la terapéutica basada en el principio de curación por los semejantes basado en la Ley de la similitud donde lo similar cura lo similar.

Este descubrimiento fundamental de Hahnemann se refiere al uso médico de sustancias altamente diluidas que causan en personas saludables, síntomas como aquellos de la enfermedad a ser tratada (2). Pero Hahnemann no se limitó a descubrir un nuevo tipo de medicamentos, sino que aportó un sistema filosófico médico innovador en Occidente, en el cual el médico debe comprender al enfermo como una totalidad en la que la mente y el cuerpo son inseparables, donde se comprende la integralidad del ser humano y se entiende que su existencia tiene un propósito y un sentido (3).

En los últimos años, investigadores de renombre y expertos en el campo de las ciencias exactas han salido en apoyo de la idea de que la medicina homeopática puede ser eficaz, proporcionando valiosos instrumentos conceptuales para el médico; de hecho ha sido posible establecer correlaciones con los nuevos descubrimientos acerca de las propiedades físico-químicas del agua (4), las aplicaciones de diagnóstico de tipo funcional, la electrodinámica y finalmente, el uso de sustancias con fines terapéuticos, obtenidos de acuerdo con el principio de similitud y altamente diluidos (5).

Vivimos en una época emocionante en el que las mal llamadas medicinas alternativas están comenzando a emerger de su larga hibernación. De éstas, la homeopatía es una de las que más rápido y extendido crecimiento ha tenido. Por una parte, esto crea grandes oportunidades para establecer la homeopatía como viable y, a menudo preferible a la medicina ortodoxa (6). Por otra parte, el crecimiento explosivo de por sí viene con un desafío: la comunidad homeopática tiene que contribuir a generar nuevos conocimientos sin perder de vista la integralidad que siempre la ha caracterizado.

Existen muchas formas para plantearnos este proceso, se tiene una gran cantidad de técnicas significativas y validas para examinar tanto el arte como la ciencia de la práctica de la homeopatía y todas ellas deben estar enmarcadas en el contexto de la medicina como una sola dentro de un enriquecimiento constante entre todos los saberes del conocimiento.

La investigación homeopática se encuentra en sus albores en el desarrollo de modelos evidenciables y un planteamiento metodológico apropiado. Este campo ya se ha encontrado con problemas serios, aunque abiertamente tendenciosos, como el controvertido metaanálisis de un reducido número de estudios de eficacia con una validez interna buena, pero con escasa validez externa, como resultado de la aceptación precipitada de las presunciones y metodologías que se adaptan mejor a los fármacos de la medicina convencional que a la investigación homeopática (7).

La investigación en homeopatía se ha enmarcado en diferentes tipos de modelos de experimentación, desde las ciencias básicas en donde se hacen determinaciones de las propiedades científicas fisicoquímicas y materiales de los remedios homeopáticos in vitro o estudios preclínicos en animales, plantas y estudios de determinación de dosis en individuos humanos hasta ensayos clínicos de comparación de los efectos del tratamiento con remedios homeopáticos frente al placebo (8).

Los escépticos frente a la homeopatía periódicamente publican artículos con diferentes errores metodológicos, que proclaman como la prueba final de que la homeopatía no es mas que un placebo (7). La realidad de la ciencia es que ningún estudio ni artículo publicado es suficiente para desacreditar todo el campo, a pesar de los prejuicios esperanzados de algunos escépticos, cualquiera que sea el tema.

Las diferentes investigaciones realizadas en homeopatía, nos indican que los medicamentos homeopáticos tienen acciones diferentes a las que genera el placebo in vitro, así como en modelos animales, y además también han demostrado los enormes beneficios en modelos humanos con una serie de síntomas y signos clínicos que desde la alopátia constituyen lo que se ha denominado enfermedad.

Los datos apoyan el concepto de que los remedios homeopáticos no son iguales a los fármacos alopáticos en cuanto a las acciones en mecanismos locales

específicos de la enfermedad, y que los efectos dinámicos y la neurofisiología de los remedios activos difieren de los del placebo (8).

El presente trabajo contribuye a cumplir el propósito de integrar y mejorar el conocimiento de la medicina apoyándose en la metodología reduccionista de la investigación actual, que si bien no es todavía la más apropiada para conocer el fenómeno homeopático; es hasta ahora sin embargo; la mejor herramienta de la que se dispone y la cual puede aportar evidencia para construir un nuevo método de investigación más cercano a los lineamientos básicos de la homeopatía.

¿Tiene efecto el medicamento homeopático, *Phytolacca americana* a nivel experimental in vitro, sobre poblaciones celulares de los linfocitos humanos?.

2. JUSTIFICACION

Considerando el creciente interés de la población en el uso de medicamentos homeopáticos y que las personas con frecuencia deciden optar por la homeopatía y otras disciplinas de las denominadas medicinas alternativas usándolas concomitantemente, se hace necesario cada vez mas generar un dialogo de saberes entre la MAC y la medicina convencional sin perder de vista la identidad de cada una de las racionalidades que confluyen en la mal denominada medicina alternativa.

La motivación mas importante en la realización de este proyecto es la de dar continuidad al trabajo realizado en una Primera Fase, donde se plantean los lineamientos generales para el desarrollo de la investigación titulada “Exploración del efecto de altas diluciones sucusionadas de *Phytolacca americana* sobre linfocitos humanos”; y se deja abierta la posibilidad de continuar con la parte experimental, de tal manera que con los resultados obtenidos se permitirá generar nuevos conocimientos acerca del efecto biológico del medicamento homeopático.

En repetidas oportunidades en la práctica clínica los médicos se ven enfrentados a evidenciar los resultados favorables que ejercen los medicamentos homeopáticos sobre los pacientes, generando cuestionamientos que en algunas ocasiones pueden llevar a plantearse preguntas que pueden generar un proceso de investigación como sucede en este caso particular. Uno de los motivos por el cual se selecciona “*Phytolacca americana*” para este experimento, tiene como antecedente el efecto obtenido en un paciente pediátrico que padecía de una Enfermedad de Rosai Dorfman o histiocitosis sinusal con linfadenopatía masiva cuyo diagnostico se efectuó desde la medicina convencional a través de pruebas de histopatología y que cursó con linfadenopatías cervicales masivas; para la cual hasta el momento no existe un tratamiento de elección; este paciente recibió un preparado homeopático de *Phytolacca americana* en una dilución 7CH ($1 \times 10^{-14}M$) con desaparición hasta hoy de las adenopatías (9).

Por otro lado demostrar a nivel experimental que la *Phytolacca americana* preparada homeopáticamente tiene un efecto biológico, aportará a aumentar el número de evidencias que demuestran ésta premisa y que podrán acumular evidencia biológica que facilitarán el manejo de entidades clínicas difíciles de tratar como los trastornos linfoproliferativos e inmunodeficiencias.

Concomitantemente, la importancia de los estudios de laboratorio en general, yace en el hecho de que estos han hecho posible obtener pruebas de los efectos de las altas diluciones/dinamizaciones bajo condiciones que excluyen el efecto de la sugestión.

Además la experimentación en modelos animales y en poblaciones celulares, con base en el conocimiento actual de los sistemas vivientes permitirá de ser necesario, una reformulación de la homeopatía y sus mecanismos, para construir modelos razonables que puedan ser examinados en diferentes niveles dentro de los sistemas biológicos, desde las células y los órganos hasta los animales y los seres humanos.

Considerando la gran importancia del trabajo multidisciplinar en grupos independientes, la Universidad Nacional de Colombia en su Facultad de Medicina en la maestría de medicina alternativa, reúne a investigadores de inmunotoxicología, bioquímica y homeopatía para proponer este modelo que examina la actividad biológica de medicamentos homeopáticos, sobre células mononucleares de sangre periférica de seres humanos teniendo en cuenta que así como en los estudios epidemiológicos la validez de la información de dichos estudios está directamente relacionada con la calidad en la selección de las muestras de las poblaciones y lo adecuado y apropiado de los métodos utilizados y que entre mejores sean estos últimos mayor será la validez interna del estudio (10), y mayor su validez externa, dando la posibilidad de aplicabilidad sobre la población al extrapolar los resultados del estudio .

De la misma manera, una de las preocupaciones más importantes hoy en día en cualquier experimento son los requisitos generales de competencia del laboratorio donde se realiza la experiencia para que esta sea repetible y luego reproducible. En homeopatía también, la calidad del modelo se ha vuelto crucial ya que una de las principales críticas a los resultados de los experimentos pertinentes, recae sobre este punto; la investigación básica tratando de aclarar la diferencia entre diluciones muy altas, preparaciones homeopáticas y soluciones control ha reportado resultados alentadores pero es escasa, aunque muy necesaria, la replicación de estas experiencias por grupos independientes, ya que los investigadores buscan cada vez nuevos modelos y experimentos pero ningún modelo ha sido replicado amplia y suficientemente.

La realización de este proyecto contribuirá a la constitución de líneas de investigación dentro de la maestría en medicina alternativa donde se integrará la homeopatía, la inmunología y la biología molecular, convirtiéndose de esta manera la Universidad Nacional de Colombia como una de las pioneras en el ámbito de la investigación en homeopatía para Colombia y Latinoamérica generando de esta manera un impacto sólido sobre la medicina integrativa que incluso se puede reflejar sobre las políticas de salud del país conllevando a mayores beneficios en salud sobre toda la población.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL: Explorar la actividad biológica de preparaciones homeopáticas del medicamento homeopático "*Phytolacca americana*", sobre Poblaciones de linfocitos.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.2.1 Explorar la inducción de mitogénesis, de linfocitos humanos expuestos al efecto de "*Phytolacca americana*" en diferentes dinamizaciones.

3.2.2 Determinar la producción de citoquinas (IL-2, IL-4,IL-6,IL-10, TNF- α , IFN- γ), de linfocitos humanos expuestos al efecto de "*Phytolacca americana*" en diferentes dinamizaciones.

3.2.3 Comparar el efecto biológico de una dilución de *Phytolacca americana* sucusionada frente a una sin sucusionar

4. MARCO TEORICO

4.1 ANTECEDENTES EN INVESTIGACION EN HOMEOPATIA

Dentro del proceso de construcción del conocimiento en medicina son válidas desde las concepciones integrativas y sistémicas hasta las del reduccionismo positivista que permiten encontrar evidencias básicas que aportan en la formulación de nuevos modelos de investigación que estén más cercanos a los lineamientos básicos de la homeopatía.

Desde hace varios años se ha buscado establecer si la homeopatía tiene un efecto biológico y se han realizado modelos experimentales tanto in vitro como in vivo que lo han demostrado. En la investigación en homeopatía a través de la historia se han realizado diversos tipos de estudios, en los cuales se busca evidencia de los efectos del medicamento homeopático, estudios sobre la estructura y las propiedades fisicoquímicas del medicamento homeopático y estudios que buscan explicaciones de la acción de éste sobre los organismos vivos (11).

Se han efectuado estudios que han acumulado una serie importante de evidencia del efecto biológico del medicamento homeopático en diferentes dinimizaciones, tanto en modelos in vitro, como sobre individuos sanos o individuos enfermos, a continuación se presentan algunos de los más relevantes.

En principio se investigó sobre grupos celulares como macrófagos, linfocitos y basófilos donde se explora la exaltación o la inhibición de las funciones celulares, entre ellos están los estudios realizados en basófilos donde se evalúa la degranulación de los mismos mediante citometría de flujo posterior a la exposición de diluciones homeopáticas de histamina, encontrando como con la histamina en altas diluciones homeopáticas se logra una inhibición de la actividad basófila estimulada por antiIgE (12,13); o el efecto proagregante y protrombótico de la aspirina diluida y sucusionada en diferentes dinimizaciones homeopáticas en experimentos realizados en las arterias mesentéricas de ratones (14,15).

Otros modelos de este tipo son los formulados por Endler en el trabajo con renacuajos y la modificación de la tasa de crecimiento de los mismos al ser expuestos al efecto de la cercanía de un preparado homeopático de tiroxina (16),

el de Wurmser donde se evalúa la cinética de excreción del arsénico en ratones envenenados tratados con un preparado homeopático de Arsénico (17) o en el que se observan los cambios morfológicos y funcionales de cultivos celulares de hepatocitos aislados sometidos a la intoxicación con tetracloruro de carbono y luego expuestos al medicamento homeopático *Phosphorus* el cual protegió de la fibrosis hepática (18).

De la misma manera se han realizado múltiples estudios en animales y plantas donde se ha demostrado el efecto biológico de los medicamentos homeopáticos, sobretodo estudios que evalúan los efectos de sustancias tóxicas que luego se han diluido y sucusionado hasta llevarlas a altas dinamizaciones como en el caso de las experimentaciones realizadas con cadmio, un potente toxico renal que luego al llevarlo a una dinamización homeopática, exponerlo a células renales de ratón y luego al tóxico logró generar una protección de dichas células comparado con las que no fueron expuestas previamente al medicamento homeopático en las que se generó un evidente efecto genotóxico (19); o por ejemplo en el ensayo experimental realizado en germinados de plantas intoxicadas con sulfato de cobre y la reversión de la intoxicación por acción de la misma sustancia pero en ultra altas diluciones *Cuprum sulphuricum* 15CH (20).

Estos modelos, utilizados por diferentes grupos de investigación son extremadamente heterogéneos y difieren unos de otros en la metodología las diluciones utilizadas y los resultados reportados. Algunas líneas de investigación, particularmente aquellas que utilizan modelos de inmuno modulación y efectos antiinflamatorios en ratones dan soporte a un real efecto de las altas diluciones homeopáticas en animales, sin embargo estos datos resultan de observaciones preliminares y no han sido replicados independientemente.

La evidencia que emerge de los resultados de experimentos en modelos animales, puede sustentar la tradicional regla de la similitud; los componentes que en altas dosis pueden ser patogénicos, en ultra bajas dosis, sucusionadas, pueden tener un efecto paradójico protector o curativo.

A pesar de unos pocos estudios, cuyos resultados son muy estimulantes para algunos autores que consideran que la homeopatía se puede evaluar adecuadamente mediante los ensayos clínicos convencionales; la efectividad de la misma como prevención o terapia en infecciones veterinarias por ejemplo, aun no

tiene un número importante de estudios clínicos aleatorizados que la soporten (21).

A nivel experimental y en la práctica cotidiana el principio de la similitud ha sido aplicado de tres maneras:

El concepto de “similia” según el cual los síntomas de un paciente pueden ser curados por una sustancia que produce esos mismos síntomas en un experimentador sano, principio que también se aplica cuando se usan medicamentos que tienen más de una sustancia, (complejos) pero que no siguen en su aplicación reglas estrictamente Hahnemannianas.

El concepto de Isopatía según el cual una sustancia que produce una intoxicación o una enfermedad a unas dosis, paradójicamente a dosis mucho más bajas produce mejoría de esta intoxicación o esta enfermedad, lo cual ha hecho retomar hoy al concepto de Hormesis (22).

El concepto de Endo-isopatía según el cual se obtienen efectos terapéuticos de autacoides o biosimilares (hormonas-mediadores, péptidos, citocinas) altamente diluidos.

Se han realizado experimentos que demuestran Inmunoestimulación utilizando componentes endógenos tales como Interferón y timulina, preparados según las técnicas homeopáticas, en los cuales α - β Interferón ($8-16 \times 10^{-10}$ IU i.p.) y hormonas tímicas (8×10^{-8} pg i.p.) producen efectos en los parámetros de la inmunidad humoral (El número de células formadoras de placa) y celular (respuestas alo-específicas de células T cito-tóxicas) los resultados varían fuertemente dependiendo del estado fisiopatológico en el cual se encuentren los animales de la experimentación (23). Por ejemplo los ratones de la cepa Swiss que son considerados inmunológicamente normales son diferentes de los de la cepa Negra Nueva Zelanda, que son considerados naturalmente inmunodeprimidos, en las primeras diluciones 4CH(1×10^{-8}) y 12CH(1×10^{-24}) de timo y timulina produjeron inmunodepresión, mientras en los segundos se produjo inmunoestimulación, otro factor que modificó importantemente los resultados es la cronobiología, cada tratamiento es percibido de una manera diferente por el organismo de acuerdo al momento del día (ritmo circadiano) o al momento del año (ritmo circa-anual) (23).

En otro experimento realizado por Bentwich se encontró que diluciones homeopáticas (de $10^{-14}M$ a $10^{-36}M$) de hemocianina aplicadas parenteralmente a ratones, aumentaron la producción de sus anticuerpos IgG e IgM, de manera significativa en comparación con controles a los que se les aplicó solución salina, cuando posteriormente se exponían a la misma proteína en dosis ponderales (24).

Son también muy conocidos los experimentos realizados con Silícea Terra 9 CH, el primero realizado por Poitevin en 1987, logrando una mayor producción de factor activador de plaquetas por macrófagos peritoneales de ratón *ex vivo* cuando se expusieron a la presencia de levaduras comparados con otros macrófagos que se estimularon con solución salina o con una preparación homeopática de Gelsemium 5CH, paradójicamente una preparación homeopática de sílicea menos diluida (5CH) tuvo menos efecto (25).

De la misma manera que se han realizado estudios en modelos celulares, animales y plantas, se continuaron los estudios con humanos como por ejemplo el ensayo experimental en el que se evaluó el efecto benéfico del polen en una dinamización 30CH, comparado con placebo en el manejo de la rinitis estacional con resultados estadísticamente significativo (26).

La protección que puede brindar un medicamento homeopático en caso de infecciones, en seres humanos, quedó registrada desde el siglo XIX, después del éxito de la terapéutica frente a la epidemia de cólera posterior a la guerra de secesión en Estados Unidos, en modelos animales el suministro por vía oral de bajas dosis de muy altas diluciones (200CH) de *F. tularensis*, en ratones, indujo cambios en la mortalidad de los ratones expuestos a dosis letales de *F. tularensis*, en comparación con aquellos que no recibieron el preparado homeopático, pero esta protección significativa comparada con la ausencia de protección, 22%, es sin embargo, muy baja comparada con la protección que brinda la vacuna que es del 100% (16).

En todos estos estudios y muchos más se ve siempre como la inmunología ha estado presente en todos ellos de distintas formas, encontrando evidencias que permiten entender el efecto biológico de las dosis altamente diluidas sobre el sistema inmune. La inmunología es una disciplina que comienza a desarrollarse con el descubrimiento de la vacuna por parte de Jenner en 1796, casi al mismo

tiempo en que la homeopatía surge como disciplina , el mismo Hahnemann en el Organon cita varias veces a "la vacuna" para referirse a sus efectos medicinales (3), desde entonces se pueden ver similitudes entre las dos concepciones que además concitan a explorar muy a fondo la fisiología del ser humano para entender cómo es que ambos fenómenos, el de la inmunología y el de la homeopatía suceden (21).

La inmuno-alergología representa un puente entre la medicina convencional y la homeopatía ya que en este campo se pueden aplicar conceptos tales como el efecto de las sustancias suministradas sobre la base del principio de la similitud y la gran sensibilidad de los sistemas biológicos a las modulaciones inducidas por ultra-bajas dosis o altas diluciones, de sustancias naturales o endógenas. Hasta ahora la inmunoterapia con alérgenos específicos es el único tratamiento inmuno modulador que puede alterar el curso natural de las enfermedades alérgicas y prevenir, por ejemplo, el desarrollo de asma atópica en pacientes riníticos. Se trata de inyectar cantidades crecientes del alérgeno detectado en pacientes sensibles con el propósito de reducir su nivel sensibilidad al alérgeno. Se cree que esta terapia funciona por medio de una combinación de efectos, como la inducción de anticuerpos bloqueadores; probablemente por la expresión y el desarrollo de linfocitos T reguladores alérgeno-específicos (27).

La inmunoterapia por vía sublingual es ahora más segura y eficaz. En animales de laboratorio el estado de tolerancia se induce con muy bajas dosis del antígeno y también con muy altas dosis del antígeno específico, dosis intermedias por el contrario causan un "priming" desencadenado una respuesta secundaria de hipersensibilidad frente al antígeno específico. De manera similar la auto-reactividad de los linfocitos T es manejada por el sistema inmune, por lo menos de dos formas, de acuerdo a las dosis del antígeno. En contacto con grandes concentraciones de auto antígenos ellos son "asesinados", pero en la presencia de bajas concentraciones ellos entran en un estado especial de inhibición. El "milieu" de la mucosa y la presencia de Interleuquinas como IL-4 e IL-10 pueden facilitar este fenómeno (27).

Otros autores han sugerido que este tipo de regulación inducida por muy bajas concentraciones de una sustancia podría servir como modelo para explicar la forma en la cual al menos algunos preparados homeopáticos producen sus efectos terapéuticos. Por lo tanto el uso de inmunoterapia sublingual es un campo

en el cual los límites de la homeopatía (en su aproximación Iso-pática) se traslapan con los de la inmunología (27).

Es muy importante también correlacionar muchos de los estudios realizados donde se evalúa la activación celular y del sistema inmune valorando la producción o inhibición de la liberación de mediadores solubles como las citoquinas; por ejemplo tenemos el estudio realizado en ratones donde se investiga la correlación entre el efecto terapéutico de dinamizaciones homeopáticas de *Mycobacterium* y mediadores endógenos de la inflamación (óxido nítrico y citoquinas) en el cual se apreció una reducción significativa de las concentraciones séricas de IL-6 y de IFN- γ por los macrófagos peritoneales y un aumento de los nitritos y nitratos de las concentraciones plasmáticas (28, 29).

Para someter a prueba el efecto biológico del medicamento homeopático en un modelo experimental, se debe tener en cuenta el efecto conocido de la sustancia cuando aún no ha sido diluida y dinamizada, es decir su farmacología y toxicología y los efectos de esa misma sustancia cuando ha sido preparada como medicamento homeopático y suministrada a un grupo de sujetos sanos en los cuales produce unos síntomas que constituyen una enfermedad artificial, patogenesia o ensayo patogenético (21).

Es muy importante ver cómo la metodología en la investigación referente a la realización de ensayos patogenéticos ha venido cambiando con el tiempo, donde en sus inicios tales experimentaciones se realizaban sobre algunos animales y/o humanos y como en la actualidad se generan dichos estudios desde modelos celulares *in vitro*, animales de experimentación y humanos donde se han efectuado modificaciones metodológicas respecto a las variables, el uso de placebos, la supervisión, el diseño de los estudios (doble ciego, controlado con placebo), las dosis y la potencia de la droga, el tiempo de observación, la descripción en detalle de los efectos toxicológicos de las sustancias antes de ser diluidas y dinamizadas (30).

En la actualidad se tienen más de 3000 sustancias experimentadas y corroboradas clínicamente, sin embargo homeópatas de todo el mundo reexperimentan estos ensayos patogenéticos de hace 200 años para corroborar los síntomas que produjeron (31).

En este trabajo se explora el efecto biológico de altas dinamizaciones de *Phytolacca americana* sobre unas poblaciones celulares de linfocitos, motivo por el

cual es necesario revisar lo que se ha estudiado de esta sustancia tanto en la tintura madre como en ensayos patogenéticos una vez se ha diluido y sucusionado para la experimentación.

4.2 *Phytolacca Americana*

4.2.1 Composición de *Phytolacca americana*

Familia: Phytolaccaceae

Nombre en latín: *Phytolacca americana* L., *Blitum Americanum*, P. *Vulgaris*, *Solanum Magnum Virginian.*, *S. Racemosus Americanum*. Español: Hierba Carmín, fitolaca, tintorera o grana, cereza de pichón, Espinaca de Indias (32).

Composición:

De esta planta de la familia Phytolaccaceae la parte usada tradicionalmente es la raíz la cual contiene mitógenos "*pokeweed*" (*denominación en Ingles de la planta*), una proteína antiviral; glucósidos triterpénicos y una proteína enzimática la Phytolacaina G. Extractos de proteínas obtenidos de raíces frescas y secas de *Phytolacca americana* han sido comparados con el preparado mitogénico comercial *pokeweed™*. La Phytolacaina G, es una proteasa de la cisteína, previamente aislada de los frutos inmaduros de *Phytolacca Americana*, mostró una alta afinidad hacia la cadena oxidada β de la insulina y también mostró actividad "lectin-like" (33).

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas naturales de origen no inmune que pueden aglutinar células y son capaces de un reconocimiento específico para un determinado carbohidrato uniéndose a él reversiblemente y produciendo efectos de hemoaglutinación y mitogénesis en células linfocitarias humanas (33).

Cinco mitogenos designados Pa-1 a Pa-5 han sido purificados de la raíz de la *Phytolacca americana*, hasta ahora de estos mitógenos, solo Pa-1 ha sido descrito como mitogénico para los linfocitos B y T murinos; los otros mitógenos solo tienen actividad sobre las células T, se ha encontrado que los linfocitos B Murinos tienen más receptores para el mitógeno Pa -1 que para los otros Pa-2 y las células T Murinas tienen más receptores para Pa-2 que para Pa-1 (34).

Cinco nuevas saponinas triterpénicas denominadas *Phytolacca*–saponinas, se aislaron de la raíz de *Phytolacca americana*. Estas saponinas revirtieron la resistencia multidrogas (MDR) en cáncer de ovario en humanos, lo cual se evaluó sobre la base de la determinación de la cantidad de calceína acumulada en células tumorales en la presencia de cada componente; la más efectiva fue la *Phytolacca*-saponina 8 (35).

4.2.2 Antecedentes de investigación con *Phytolacca americana*

Algunos de los más importantes estudios que se han realizado con *Phytolacca americana* han explorado sus efectos en individuos sanos y en individuos enfermos, expondremos algunos de ellos.

Dos estudios reportaron el efecto de *Phytolacca americana* sobre la transformación linfoblástica, donde se habla de la glicoproteína pokeweed, la cual induce la transformación linfoblástica de linfocitos B en cultivos (36,37).

En estos experimentos se exploró el efecto mitogénico sobre linfocitos previamente estimulados por dosis ponderales de phytohemagglutina (PHA) en diluciones homeopáticas 5CH, 7CH y 15CH donde se observó un efecto inhibitorio sobre la mitosis máximo efecto para la dinamización 15 CH en un estudio (36) y para la dilución 7CH en otro (37).

La *Phytolacca americana* ha sido también usada empíricamente en homeopatía por muchos años desde antes que su acción inmunológica fuera conocida en numerosas condiciones que van desde las adenopatías, hasta mononucleosis infecciosas y enfermedades virales del tracto respiratorio (38).

También se ha estudiado el efecto inmunomodulador de algunos preparados homeopáticos (*Phytolacca americana* e *Histaminum hydrocholridum*), por sí mismos o cuando se combinan con preparados antigénicos desencadenando de forma selectiva respuesta de citoquinas inducidas por los linfocitos Th1 o Th2 y/o desencadenar la respuesta inmunitaria innata de macrófagos y de células NK; los resultados son variables, donde la preparación de *Phytolacca americana* tiene tendencia a reducir la producción de citoquinas Th2 y aumentar la producción de citoquinas Th1 inducida por la PHA. En cambio en ausencia de LPS, la preparación de *Histaminum* aumenta la producción de citocinas Th2, sin embargo

este estudio aunque es relevante como antecedente para el estudio actual, no es muy claro en cuanto a su significancia estadística (39).

En un estudio mas reciente en el cual se realiza un experimento con *Phytolacca*, *Carcinosin*, *Conium* y *Thuja* se explora la actividad de estos medicamentos homeopáticos frente a dos tipos de líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano, se puede demostrar como las altas dinamizaciones homeopáticas de estas sustancias, ejercieron un efecto citotóxico sobre dichas líneas celulares e indujeron apoptosis celular; efectos que fueron acompañados por alteración de la producción de proteínas reguladoras del ciclo celular, incluyendo una regulación negativa de la proteína Rb fosforilada y una regulación positiva de CDK p27, los cuales son probablemente los responsables del retraso del ciclo celular así como la inducción de la cascada apoptótica la cual se manifiesta por la activación de la caspasa 7 y clivaje de PARP (40).

4.2.3 Experimentación Patogenética de *Phytolacca americana*

Los polos de acción de la *Phytolacca americana* de acuerdo con la experimentación pura han sido la mucosa faríngea, las glándulas mamarias, los tejidos óseos, fibrosos y musculares.

A nivel faríngeo es importante la inflamación que se presenta a nivel de la mucosa, con sensación de faringe seca y dolorosa, los pilares se muestran congestionados y de color rojo sombra, con amígdalas hinchadas y uvula edematizada casi transparente, de color rojo o de color púrpura, a veces se ven puntos blancos que se unen formando placas, sobretodo de predominio derecho; también hay linfadenopatías cervicales con ganglios doloridos, rigidez en el cuello, con sensación de cuerpo extraño en la garganta y constante deseo de tragar (41).

Las amígdalas se tornan rojas, hinchadas, con puntos blancos que a veces confluyen formando placas, con dolor que irradia hacia el oído, la sensación del dolor es de magulladura y con sensibilidad en la cabeza, en la espalda y en los miembros (42).

Phytolacca americana es un remedio de acción patogenética con un fuerte tropismo glandular, las glándulas se vuelven inflamadas y duras, con inflamación de las glándulas del cuello, especialmente la submaxilar y parótida, pero parece que el remedio se centra en la glándula mamaria, dando como resultado un dolor en el pecho, dolor en los senos sobretodo relacionado con las menstruaciones; posee la habilidad de delatar la formación de crecimientos malignos, especialmente en los senos, tumores glandulares que se vuelven duros y escirrosos (43).

A nivel del aparato locomotor se presentan en la experimentación patogenética algunos tipos de síntomas como el de la gota y reumatismo articular, reumatismo agudo que tiende a la cronicidad con dolores que son peor de noche, agravados por el calor de la cama, dolores fulgurantes, rápidos como una sacudida eléctrica, lancinantes, perforantes, que cambian fácilmente de lugar. Muy útil en los dolores tipo ciática con sensación de dolorimiento y dolores lancinantes, tironeantes, latentes, localizados particularmente en la cara interna del muslo y también en la cara posterior, estos dolores se agravan por movimiento, presión y de noche después del sueño; el calor y el reposo los mejoran (44).

Desde la homeopatía clínica se afirma que entre las principales indicaciones de *Phytolacca americana* están: anginas, amigdalitis, faringitis, parotiditis, mastodinia del síndrome premenstrual, mastitis, neuralgias, dolores ciáticos, talalgias, dolores óseos, síndromes febriles, estados gripales, cicatrices induradas dolorosas, blefaritis, orzuelos, chalacios (45).

Conociendo la patogenesia de *Phytolacca americana*, podemos entender de una mejor manera, por qué este medicamento homeopático fue utilizado en el paciente con diagnóstico de Enfermedad de Rosai-Dorfman; por tal motivo haremos una breve referencia de esta entidad clínico-patológica.

4.3 ENFERMEDAD DE ROSAI-DORFMAN

La enfermedad de Rosai-Dorfman es una enfermedad histiocítica proliferativa rara, definida por los hallazgos histológicos y cuya manifestación clínica más frecuente son linfadenopatías masivas y de gran tamaño, sobre todo cervicales,

acompañadas de afectación extraganglionar (en casi la mitad de los casos) de cualquier órgano corporal.

Fue descrita como entidad diferenciada en 1969 y 1972 por Rosai y Dorfman. Su causa es desconocida, aunque se cree que podría tratarse de una alteración del sistema inmunológico. Tampoco su patogenia es clara ni existe un tratamiento de elección. Afecta a niños y jóvenes en la primera y segunda década de la vida (46).

El cuadro clínico inicialmente es inespecífico, se distingue por fiebre, faringitis, malestar general, pérdida de peso, con duración variable y linfadenopatías cervicales bilaterales en 90% de los casos, aunque en los adultos pueden estar afectadas otras regiones ganglionares, como la axilar, inguinal, paraaórticas y mediastinales. Estos ganglios hipertrofiados son indoloros, de gran tamaño, fácilmente detectables y suelen producir deformidad de la región afectada, e incluso producir alteraciones de las funciones vitales (compresión de la tráquea o del nervio óptico). Pueden localizarse en las extremidades, el tronco y la cara en orden descendente.

La enfermedad se considera de curso benigno por la remisión espontánea de forma permanente en una proporción considerable de los casos, pero clínicamente se han descrito cinco patrones de evolución: 1) remisión completa y espontánea (50% de los casos); 2) curso crónico con exacerbaciones y remisiones; 3) enfermedad persistente y estable (con permanencia hasta por 19 años); 4) enfermedad progresiva y 5) diseminación ganglionar y extraganglionar con evolución fatal (7% de los casos).

Es poco frecuente la evolución a malignidad, pero en algunos casos se ha reportado asociación con linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin y mieloma. A pesar de considerarse una enfermedad benigna, por su curso clínico generalmente favorable en forma espontánea, existe un riesgo sustancial de compresión asociado con grandes masas tumorales, especialmente en casos de afectación neurológica. En las vías respiratorias altas, localización más frecuente después de la cutánea, se relaciona con epistaxis, congestión nasal, disfonía e, incluso, invasión del conducto auditivo con pérdida de la audición.

La enfermedad se manifiesta con mayor gravedad en el sistema nervioso central, con pérdida de funciones sensoriales como la audición o motoras como la para-

plejía, cuadriparesia e incontinencia urinaria, o simular tumores intracraneanos, meningiomas o afectación meníngea.

No existen datos de laboratorio específicos para el diagnóstico, sólo se observa anemia normocítica-normocrómica persistente de leve a moderada. En 90% de los pacientes existe elevación de la velocidad de eritrosedimentación (VSG) y con frecuencia hay concentraciones elevadas de inmunoglobulinas (gammapatía policlonal), y ocasionalmente se detectan autoanticuerpos (antiplaquetarios y antinucleares). En algunos casos la enfermedad de Rosai-Dorfman se asocia con otras enfermedades autoinmunitarias (artritis reumatoide) o alérgicas (asma) con alteraciones en los patrones de respuesta Th1 y Th2 con inflamación y desequilibrio de citocinas.

No hay un consenso mundial en cómo se debe iniciar el tratamiento, cuando está indicado; sin embargo, se sugiere la combinación de acuerdo con cada caso individual con cirugía (resección, láser de CO₂ o crioterapia), corticoesteroides (metilprednisolona, dexametasona), antimetabolitos (etopósido) e Interferón alfa. Ningún tratamiento ha mostrado inocuidad y eficacia definitivas. Los esteroides orales han disminuido la linfadenopatía cervical con fiebre en algunos pacientes con enfermedades autoinmunitarias. También se han combinado otros fármacos inmunorreguladores como la hidroxiclороquina: 200 mg cada 12 horas durante 7 días, más sulfonas 100 mg por 21 días y prednisolona 30 mg durante 21 días, con resultados muy variables. Algunos reportes recientes indican buenos resultados con la administración de metotrexato en enfermedad cutánea, o talidomida a dosis elevadas (300 mg/día). Cuando se produce compresión extrínseca por infiltración ganglionar en órganos o tejidos vitales como la tráquea, se debe recurrir como medida urgente a la radioterapia y la descompresión quirúrgica (47).

El efecto que se va a explorar en éste estudio es la activación celular valorada por la acción sobre la división celular o mitogénesis y de la respuesta celular mediada por citoquinas sobre poblaciones de mononucleares, específicamente linfocitos T, por lo cual nos referiremos brevemente a estos aspectos.

4.4 LINFOCITOS T Y B

Cualquiera de las células del sistema monuclear no fagocítico competente desde el punto de vista inmunitario es un linfocito.

Los linfocitos según su origen embrionario desarrollo y función, se dividen en linfocitos B y linfocitos T. Cuando los linfocitos se activan por entrar en contacto con un antígeno, ponen en marcha la síntesis de macromoléculas, cambian de tamaño y pasan a llamarse linfoblastos, se diferencian luego en células de memoria y en las diferentes clases de células efectoras, los linfocitos B en células plasmáticas y los linfocitos T en células cooperadoras, citotóxicas y supresoras.

Los Linfocitos B son aquellos que en las aves maduran en la bursa de Fabricio y son los responsables de la producción de anticuerpos, las inmunoglobulinas; es decir de la inmunidad humoral. En los seres humanos dicha maduración se lleva a cabo en la médula ósea y estos linfocitos se caracterizan por la presencia en su superficie de Inmunoglobulina (Ig)M e IgD que son sus receptores antigénicos. Cuando se produce la estimulación antigénica se requiere la participación de los Linfocitos T cooperadores y macrófagos para proliferar y convertirse en células plasmáticas y linfocitos B de memoria que son específicos para el antígeno que desencadena la respuesta.

Los linfocitos T se originan en las células linfáticas precursoras, que desde la médula ósea migran al timo y una vez allí se diferencian bajo la influencia hormonal de la timopoyetina y la timosina en los linfocitos responsables de la inmunidad celular ; se caracterizan por la presencia específica de marcadores de superficie que se expresan en todos los linfocitos T maduros, los antígenos CD3 en los humanos y los Thy-1 en los murinos, existen además otros marcadores que caracterizan subgrupos celulares de linfocitos T que cuando son estimulados por un antígeno proliferan y se diferencian en linfocitos de memoria y diferentes sub-poblaciones celulares reguladoras y efectoras, estos marcadores son receptores que responden únicamente a antígenos relacionados con el propio complejo mayor de histo-compatibilidad: los linfocitos T cooperadores (Helper), citolíticos (citotóxicos), supresores, nulos, asesinos y asesinos naturales (48).

4.5 CITOQUINAS

La respuesta inmune para ser estimulada y modulada requiere de múltiples interacciones entre las células del sistema, muchas de estas interacciones requieren un contacto directo entre las células, otras dependen de mediadores de acción corta, solubles, denominados citoquinas (49), los cuales son péptidos de bajo peso molecular liberados por linfocitos, células efectoras y células

presentadoras de antígenos, también por células del mesénquima y por células endoteliales. En principio por su relación con los linfocitos fueron clasificadas como linfoquinas pero hoy en día se denominan de forma genérica como citoquinas.

Son muy potentes aun en pequeñas concentraciones. Su acción puede limitarse a actuar sobre las células que las segregan (acción autocrina), sobre células vecinas (acción paracrina), o sobre células a distancia (acción endocrina). Diferentes células pueden segregar la misma citoquina y una misma citoquina puede actuar en diferentes tipos celulares (pleiotropas). Diferentes citoquinas pueden tener la misma función, se producen frecuentemente en cascada, una citoquina estimula las células destinatarias a producir citoquinas adicionales.

Las citoquinas regulan la transcripción de genes para inducir la diferenciación o proliferación de determinadas células. Cumplen un papel esencial en el sistema inmunitario a través de la activación de células T, B y macrófagos. Actúan como factores de maduración de las células sanguíneas promoviendo la diferenciación y proliferación de células hemáticas. Ejercen acciones en respuesta inflamatoria. TNF- α ejerce acciones citotóxicas sobre algunos tumores malignos.

Se han descrito mas de 100 citoquinas, los grupos que llevan a cabo las funciones mas importantes son las interleuquinas (IL), los interferones (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el factor estimulador de colonias de monocitos granulocitos (GM-CSF), que estimula la hematopoyesis (50).

4.5.1 Clases de citoquinas

Aunque son producidas por muchas células y actúan sobre muchas células, las citocinas pueden clasificarse en cinco grupos dependiendo de en donde se produzcan y cuales sean sus efectos:

1-Citoquinas que median la inmunidad natural: son producidas primordialmente por los macrófagos, este grupo está conformado por el TNF- α , la IL-1 la IL-6 y los interferones de tipo 1, los interferones protegen frente a infecciones virales, mientras las otras citoquinas inician respuestas proinflamatorias específicas como la activación de los monocitos y del endotelio de reactantes hepáticos de fase aguda.

2-Citoquinas que regulan el crecimiento, la activación y la diferenciación de los linfocitos: Son las Interleuquinas IL-2, IL-4, IL-12, IL-15 y el factor transformador del crecimiento alfa (TGF- α), IL-2 e IL-4 favorecen el crecimiento y diferenciación de los linfocitos, IL-10 y TGF- α ,amortiguan las respuestas inmunitarias. Se puede decir que algunas de ellas engloban la respuesta mediada por células como la IL-2, se denominan Interleuquinas Th1, mientras que otras (IL-4, IL-10) se consideran citoquinas que promueven aspectos de la inmunidad humoral y antagonizan los efectos de las arriba nombradas, estas son las Th2.

3-Citoquinas que estimulan la acción de células inflamatorias: Proviene de linfocitos T y son el Interferón gamma (IFN- γ) considerado Th1, TNF- α , linfotóxica o TNF- β y el factor inhibidor de la migración. Activan la función de células efectoras sin especificidad de antígeno.

4-Citoquinas que reclutan a otras células hacia el lugar de la lesión, quimiocinas: se sintetizan en los macrófagos activados, en las células del endotelio y en los linfocitos T. Son estructuralmente diferentes de las otras citoquinas, según el ordenamiento de determinados aminoácidos (cisteína) se denominan C-C o C-X-C, las primeras o C-C se derivan de los linfocitos T y comprenden la proteína quimioatrayente de los monocitos 1(MCP-1) y la proteína inflamatoria monocítica 1 α (MIP-1 α), las segundas o C-X-C como la IL-8 se fabrican en las células de los tejidos y en los macrófagos activados.

5-Citoquinas que estimulan la formación de células sanguíneas: Los linfocitos y las células del estroma de la médula ósea son sus fuentes principales, en una época se denominaron factores estimulantes de colonias (Colony Stimulant Factor, CSF) por su acción sobre el crecimiento de colonias de células hematopoyéticas a partir de sus precursores medulares. CSF-GM actúa sobre granulocitos y macrófagos, CSF-G sobre granulocitos y ligando *c-kit*, que actúa sobre células progenitoras totipotenciales (49).

Para finalizar es importante aclarar algunos términos claves referentes a las preparaciones homeopáticas, que se utilizan a lo largo de todo el trabajo, como las palabras potencia y dinamización, las cuales son términos sinónimos que se utilizan para denominar al medicamento homeopático y que son esenciales para diferenciar a éste último de una simple dilución (21).

4.6 PREPARACIONES HOMEOPATICAS

El medicamento homeopático se prepara a partir de un material (tintura madre, material de inicio o material crudo) que se tritura en azúcar de leche si es insoluble, para luego ser agregado a una mezcla de agua y alcohol o se diluye en agua y en alcohol si es soluble; esta dilución es progresiva y se realiza secuencialmente tomando siempre una parte de la dilución para rediluirlo en un número fijo de partes de solvente, realizando así diluciones de una parte en noventa y nueve cada vez, o de una parte en cincuentamil, o de una parte en diez lo cual da el nombre de la escala de dilución o potenciación de la preparación, centesimal (C), cincuentamilesimal (LM) o decimal (D) respectivamente. Entre dilución y dilución el recipiente debe ser sucusionado (agitado) fuertemente y es entonces cuando se habla de una **dinamización o potencia** y no solamente de una dilución ya que el efecto de la sustancia muy altamente diluida solo se presentara si se realiza este procedimiento de *potenciación* de la dilución. Este término nace con la homeopatía y es consustancial a ella. La explicación de cómo se da este fenómeno, no es tema de este trabajo, sin embargo se ha postulado que el agua adquiere una información de carácter electromagnético que le permite generar un efecto biológico relacionado con la sustancia originalmente diluida (21).

Es necesario aclarar el motivo por el cual se van a emplear las dinamizaciones 6CH, 15CH y 30CH de *Phytolacca americana* en el presente modelo, para ello se tomarán como antecedentes algunos estudios ya efectuados.

Los trabajos de Endler, y los múltiples estudios citados en su libro nos ilustran acerca del tema; lo que él encontró es que altas y bajas potencias de Tiroxina y medicamentos procesados electrónicamente (registrando y grabando la señal electro-magnética emitida por el medicamento y transmitiéndola luego a un vehículo acuoso el cual generó el mismo efecto biológico del medicamento que emitió la señal), a partir de la información de la Tiroxina, son capaces en ciertas condiciones de inhibir el desarrollo de las larvas y en otras de estimularlo según el modo o frecuencia y el momento de administración o exposición al medicamento (51).

En otros trabajos como el controvertido de Benveniste publicado y criticado en Nature (52,53) se muestra también que diferentes potencias tienen también diferentes efectos sobre el mismo modelo (cambios en la coloración de basófilos, que se producen cuando se degranulan; frente a muy altas diluciones

homeopática de anti Ig-E.). Por lo anteriormente enunciado se utilizaron por lo menos tres diferentes potencias (diluciones-sucusionadas) del medicamento *Phytolacca americana* para la realización de este experimento. Dichas potencias o diluciones homeopáticas corresponden según la escuela Francesa a diluciones bajas medias y altas que teóricamente tienen, en la clínica en humanos espectros de acción diferentes (54).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 PREPARACIÓN DE FORMULACIONES HOMEOPÁTICAS DE *Phytolacca americana*

La *Phytolacca americana* se prepara de acuerdo a la farmacopea homeopática de los Estados Unidos Mexicanos (32) la regla de preparación es la número 3 para la escala centesimal: Seis volúmenes (gotas) de tintura madre (Importada de Farmacia Hahnemann, Santiago de Chile, distribuida bajo formulación médica en la Farmacia Homeopática Similia Bogotá) con noventa y cuatro volúmenes de Alcohol al 45% constituyen la dinamización 1CH (Centesimal Hahnemanniana).

Un volumen de la dinamización 1CH con noventa y nueve volúmenes de alcohol al 95% constituyen la dinamización 2CH. Las dinamizaciones subsecuentes se preparan con un volumen de la dinamización anterior y noventa y nueve volúmenes de alcohol al 95%, hasta obtener las dinamizaciones 6CH (4,8 pg de *Phytolacca americana* /ml), 15 CH ($4,8 \times 10^{-18}$ pg/ml) y 30CH ($4,8 \times 10^{-48}$ pg/ml).

Es importante anotar que a partir de la dinamización 4ch el solvente utilizado en las dinamizaciones siguientes fue solución salina normal con el fin de dar un medio isotónico a las células de experimentación y conservar de esta manera su viabilidad.

Después de realizar la dinamización 5 ch se obtuvieron a partir de ésta dos diluciones 6ch, en una de ellas se efectuó el proceso de succión tal como se describe en la farmacopea homeopática y en la otra dilución 6ch se obvió este paso. Las dinamizaciones subsecuentes a la 6 ch se siguieron preparando a partir de la dinamización sucusionada.

Tal como lo describe la Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos el número de succiones que se realiza para cada una de las dinamizaciones es de 100 succiones (32).

1 gota de *Phytolacca americana* TM pesa 32 miligramos y 1 ml de *Phytolacca americana* TM equivale a 25 gotas. Las preparaciones homeopáticas de

Phytolacca americana fueron preparadas en la Farmacia Homeopática Equilibrio Bogotá .

5.2 CULTIVO CELULAR

Las células mononucleares se obtuvieron a partir de sangre periférica heparinizada de 12 voluntarios. De una muestra de 16 personas a quienes se les realizó una historia clínica completa, se eligieron 12 donantes, los cuales se encontraban en un aparente buen estado de salud, los criterios de inclusión fueron: ser adultos entre 18 años y 50 años, sexo masculino o femenino; los criterios de exclusión fueron: haber presentado cualquier sintomatología infecciosa durante el último mes, tener antecedentes de enfermedades crónicas, especialmente si afectan el sistema inmunológico (alergias, inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes), estar recibiendo cualquier tipo de tratamiento farmacológico alopático o tratamiento homeopático.

Posterior a la elección de los participantes del estudio, se les explicó en que consistía la investigación, la confidencialidad de los datos aportados, los riesgos del procedimiento y los posibles usos de los resultados de la investigación, ante lo cual todos estuvieron de acuerdo en su participación y previo a la donación de la muestra de sangre todos firmaron el consentimiento informado. (Anexo No. 1).

Para el cultivo de las células mononucleares se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL-life Technologies Inc, Grand Island, NY) suplementado con 2 mM L-glutamina (Gibco BRL-Life Technologies Inc, Grand Island, NY), 1% de amino-ácidos no esenciales, 1000 U/mL penicilina, 0.1mg/mL estreptomina, 0.25ug/mL anfotericina B (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), 24 mM de bicarbonato de sodio (Sigma), 25 mM de HEPES (Gibco) y 10 % de plasma autólogo.

5.3 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCS)

Las PBMCS fueron obtenidas a partir de 12mL de sangre periférica heparinizada mediante el uso de un gradiente de densidad. Una proporción de 2 volúmenes de

buffy coat diluido por 1 volumen de Ficoll-Hypaque fueron centrifugados durante 30 minutos a 3000 r.p.m. La fracción de células blancas obtenida fue resuspendida en 8 mL de RPMI-1640 (Gibco BRL-life Technologies Inc, Grand Island, NY) y lavadas tres veces con medio sin suplementar. El rendimiento y la viabilidad celular se determinó utilizando la tinción con azul de tripán y conteo en cámara de Neubauer.

5.4 ENSAYO LINFOPROLIFERACIÓN

En breve, 2×10^5 PBMCs por pozo fueron expuestas durante 72h a las diferentes soluciones de *Phytolacca americana* a evaluar (6ch, 15ch, 30ch dinamizadas y una solución 6ch sin sucusionar). Como controles se incluyeron células sin exponer a las soluciones (control negativo) y células expuestas a 50 ug/mL, 5 ug/mL y 0.5 ug/mL de Pokeweed (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) y 20ul/mL, 4 ul/mL y 0.1 ul/mL de PHA (Gibco BRL-life Technologies Inc. Grand Island, NY) (utilizados como controles positivos). Finalizado este periodo de incubación, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para su uso en la cuantificación de mediadores solubles y se adicionaron 100ul por pozo de una solución de resazurina 44 uM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Las muestras fueron incubadas durante 4 horas a 37 C, 5% CO₂ y finalizado este periodo se realizó la lectura de las placas de cultivos en un espectrofluorómetro (excitación 535nm, emisión 590nm) (Tecan, Genios). Cada ensayo fue montado por duplicado para cada una de las variables a evaluar.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS DEL PERFIL TH1 - TH2

50 µL de perlas de captura para cada una de las citoquinas evaluadas (Interleuquina IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN- γ), 50µL del reactivo de detección de PE y 50µL de los sobrenadantes de cultivo fueron mezclados e incubados durante tres horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Simultáneamente, se montaron los estándares de calibración. Finalmente, se retiró el anticuerpo de detección - PE no unido y las muestras fueron leídas mediante el uso de citómetro de flujo FACS Cantoll (B.D – San Diego, CA, USA) y analizadas utilizando el software FACS Diva (B.D Biosciences – San Diego, CA, USA) y Fcap Array (Soft Flow Inc, USA)

5.6 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).

6. RESULTADOS

6.1 RESPUESTA DE MONONUCLEARES A ESTÍMULO MITOGÉNICO

Como es conocido, el Pokeweed, ha sido tradicionalmente empleado como un óptimo promotor de la mitosis de linfocitos T y particularmente de linfocitos B (55,56), razón por la cual su empleo como control positivo de la proliferación celular, es relevante en los ensayos *in vitro* que pretenden el análisis de la actividad celular en respuesta a un tratamiento.

A la luz de lo anterior, y con el fin de conocer la capacidad de respuesta de los PBMCs de voluntarios sanos a un estímulo mitogénico, se determinó la capacidad de respuesta a 50, 5 y 0,5 ug/mL de Pokeweed. La concentración fue establecida a partir de estudios previamente reportados (57). Acorde a lo esperado, la concentración óptima para inducir un estímulo mitogénico controlado fue de 5 ug/mL.

Como la activación de una población celular, no sólo puede ser definida por su capacidad de dividirse frente al estímulo mitogénico/antigénico, se cuantificaron los niveles de citoquinas (tanto pro como antiinflamatorias) en los sobrenadantes de cultivo de las células expuestas ó no al Pokeweed. En la figura 1 presentamos los niveles de citoquinas inducidos por Pokeweed, en contraste con las células cultivadas en ausencia de tratamiento.

6.2 RESPUESTA MITOGÉNICA DE MONONUCLEARES FRENTE A DINAMIZACIONES DE *Phytolacca americana*

Una vez determinada la capacidad de respuesta de los PBMCs, se co-cultivaron las células con tres dinimizaciones diferentes de *Phytolacca americana* 6CH, 15CH y 30CH. Los resultados se pueden ver en la Tabla 1. Tal como se aprecia en la Figura 2, en las tres dinimizaciones de *Phytolacca americana* se presenta efecto de linfoproliferación, sin embargo podemos ver como es mayor el efecto de linfoproliferación en la dinamización 6CH comparado con la dinamización 15CH ($p < 0,05$) y comparado con la dinamización 30CH ($p < 0,05$) Tabla 2 Análisis estadístico comparativo entre las diferentes dinimizaciones.

6.3 RESPUESTA MITOGENICA DE *Phytolacca americana* DEPENDIENTE DEL EFECTO DE LA SUCUSIÓN.

Como el proceso de sucusión toma una particular importancia en la preparación del medicamento homeopático, se analizó la respuesta de las células expuestas a dos dinamizaciones 6CH, con y sin sucusión. Los resultados presentados en la Tabla 2 y tal como se puede ver en la figura 3, resultan significativos a nivel de la capacidad mitogénica de una misma dinamización sin la última sucusión. Las células expuestas a la 6CH sin la última sucusión, no responden al tratamiento, no activan su mecanismo de división celular ($p < 0,05$).

6.4 CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS FRENTE A LA EXPOSICIÓN DE *Phytolacca americana* EN DIFERENTES DINAMIZACIONES

Reiterando nuevamente que la activación de una célula no sólo se manifiesta mediante su capacidad de proliferar frente a un estímulo antigénico, sino que se acompaña en la mayoría de los casos de un proceso de diferenciación mediado por mediadores solubles (citoquinas, quemoquinas), éstos se evaluaron a partir de los sobrenadantes del cultivo de las células expuestas a cada una de las dinamizaciones, incluida la 6CH sin sucusión tal como se muestra en la figura 4.

Se puede observar que no hay ningún tipo de modulación asociada con las dinamizaciones a nivel de mediadores como IFN- γ e IL2 e IL4 (citoquinas asociadas con un perfil Th1 y Th2, respectivamente), dado que los niveles de secreción de estas proteínas son equiparables con los niveles basales (células en cultivo en ausencia de tratamiento), ver análisis estadístico en la Tabla 3.

Sin embargo, a nivel de mediadores pro inflamatorios como TNF- α e IL6 y asociados con un perfil regulador como IL10, si se denota una disminución en los niveles de citoquinas inducidos por el tratamiento con las dinamizaciones, respecto al nivel basal ($p < 0.05$), ver tabla 4.

7. DISCUSION

Tal como se planteó al inicio del trabajo en los objetivos, se buscó explorar la actividad biológica del medicamento homeopático *Phytolacca americana*, una forma de hacerlo es determinando la actividad mitogénica o la producción de mediadores de comunicación celular como interleuquinas tanto de la respuesta Th1 como Th2 sobre poblaciones celulares de linfocitos T cultivados in vitro.

Las diluciones de pokewed son soluciones con concentraciones que tienen una actividad mitogénica, éstas se utilizaron como controles experimentales, con el fin de evaluar cual era el comportamiento in vitro de la actividad de los grupos celulares de linfocitos, puesto que para el resto del análisis del estudio es determinante tener total confiabilidad respecto a que se estuviera frente a células que tienen la posibilidad de responder ante un estímulo.

Teniendo como punto de partida estos hallazgos podemos entrar a analizar los resultados obtenidos con las tres dinamizaciones 6CH, 15CH y 30CH sobre la proliferación celular, en la cual se muestra claramente como el medicamento homeopático en las tres potencias genera una actividad biológica importante, de lo cual podemos discutir algunos aspectos relevantes.

Se sabe que en las diluciones homeopáticas después de la 12CH, se ha sobrepasado el número de Avogadro y no queda la mínima porción molecular original capaz de existir en libertad y portadora de propiedades. Esto sucedió al aplicar la constante de Avogadro a mediados del siglo XIX que estableció que la masa molecular no podía dividirse infinitamente, existía un límite. La noción de lo infinitesimal (junto a la noción de nanofarmacología, alta dilución o baja dosis) sufre así una transformación decisiva. Siendo que las diluciones agitadas mucho después del límite de Avogadro establecen al solvente como el factor central de su actividad farmacológica y de la perpetuación de su efecto en el agua (58). La creciente evidencia de la fisicoquímica de las diluciones agitadas aparece en los escritos científicos desde 1988 con los hallazgos experimentales del inmunólogo francés Jacques Benveniste (52).

La evidencia experimental en animales sanos también muestra que aún en dinamodiluciones superiores al número de Avogadro se logra incidir en la producción de las neurohormonas dopamina y catecolaminas cerebrales (59).

Esto confirma la capacidad de dichos fármacos de actuar en funciones a nivel de diencéfalo. En los experimentos fisiológicos diseñados por Sukul (60) se implantan microelectrodos en el hipotálamo de ratas conectadas a un osciloscopio. Después de registrar las frecuencias de descarga basal, se colocan unas gotas de *Natrum muriaticum*, 30CH y 200CH a la lengua, registrándose un patrón de respuesta definido en el osciloscopio (61).

Tal como se ha podido establecer en estudios previos, en éste experimento se corrobora que las potencias por encima de la 12CH, es decir la 15CH y 30CH poseen una actividad biológica que se manifiesta por la actividad mitogénica de los linfocitos T. Estos resultados llevan a plantearse la pregunta respecto a mediante que mecanismo se produce un efecto sobre estas células cuando desde el punto de vista molecular solamente se tendría un solvente, acaso éste contiene las mismas propiedades pero sin tener moléculas?. Para intentar resolver este cuestionamiento tenemos que remontamos a toda una serie de estudios que han intentado explicar la estructura y propiedades fisicoquímicas de los solventes dinamizados.

Cada vez hay más evidencia que la actividad biológica de la dinamización homeopática no se debe a su estructura bioquímica, probablemente dependa de las características fisicoquímicas del solvente para lo cual se han realizado algunos estudios que buscan esclarecer este punto.

En este tipo de investigaciones están los estudios de espectrofluorimetría; teóricamente las moléculas que tienen la propiedad de fluorescer son detectadas y medidas, y al disminuir en la solución por aumentar la dilución, la intensidad de la fluorescencia en las gráficas decrece hasta desaparecer. En el medicamento homeopático este fenómeno se observa hasta el límite universal de dilución, es decir hasta llegar a la dilución equivalente a 10^{-23} que corresponde al número de Avogadro. Resulta notable y de importancia que en las dinamizaciones que rebasan este número la fluorescencia continúa presente, siendo en ocasiones la intensidad de éstas mayor que en dinamizaciones inferiores. Otro fenómeno verdaderamente notable es que desde las dinamizaciones bajas (1D, 1CH, 2D, 2CH), sustancias que teóricamente no debieran fluorescer por ser compuestos simples e ionizables, como el *Natrum muriaticum*, *Antim tartaricum*, *Arsenicum*

album, *Calcarea carbonica*, o *Mercurius solubilis*, cuando son preparados de acuerdo a la farmacología homeopática, presentan siempre fluorescencia (62).

También se ha intentado dar explicación a este fenómeno a través de la termoluminiscencia, uno de los experimentos mas contundentes es el realizado por Louis Rey quien muestra cómo la estructura de los enlaces hidrógeno en agua pura resulta muy diferente de las altas diluciones *homeopáticas de Lithium muriaticum* 15CH y *Natrum muriaticum* 15CH (63). Rey concluye que las diluciones homeopáticas cambiaron la estructura del hidrógeno en el agua pesada. En efecto, el *Lithium muriaticum* en concentración destruye los puentes de hidrógeno, asimismo el *Natrum muriaticum* aunque en menor grado. Justamente el pico fue menor para la dilución homeopática 15CH de *Natrum muriaticum* y casi desaparece en la dinamización 15ch de *Lithium muriaticum*. También concluye que la dinamización homeopática es un solvente acuoso organizado en estructuras de hidrógeno en torno a los átomos del soluto disuelto. Al diluirlas y agitarlas muchas veces, dichas estructuras hidroalcohólicas sobreviven de alguna manera aunque desaparezca la tintura o el soluto original (63).

Para nombrar otro tipo de estudios en los que se busca esclarecer si hay algún cambio en las propiedades fisicoquímicas del solvente de las dinamizaciones homeopáticas se tienen los estudios de resonancia magnético nuclear.

Un estudio realizado por el Dr. Bernard Poitevin y su grupo de colaboradores analizan dinamodiluciones centesimales de *Silicea* preparadas según la farmacopea homeopática francesa pero con agitaciones por vortex (64). Se estudiaron dinamizaciones 1CH, 4CH, 7CH, 10CH y 13CH. Los controles fueron dinamodiluciones seriadas equivalentes pero con agua pura agitada y 0.9% NaCl en agua. Los resultados sugieren que la *Silicea* tiene un efecto desestructurador en el agua. Destacan que otras sustancias como la urea causan efectos similares y se atribuyen al rompimiento de enlaces de hidrógeno provocado por un incremento en el movimiento molecular. Los efectos detectados con las dinamizaciones son muy similares a los encontrados en diluciones sustanciales y estadísticamente muy significativos (64).

Cuando se observa la variación significativa que se genera en la dilución 6ch sucusionada, comparada con la dilución 6CH sin sucusión con respecto a la presencia de linfoproliferación en la primera y ausencia por completo de mitogénesis en la segunda, entramos en otra discusión también muy relevante en

la preparación del medicamento homeopático, relacionada con el efecto que tiene la sucusión sobre la acción patogenética del mismo.

Para tratar de dar explicación a este fenómeno hay que referirse a los estudios donde se investiga el efecto de la sucusión sobre las propiedades fisicoquímicas del medicamento homeopático, entre las que se pueden mencionar una de las más significativas; el estudio de la termodinámica de las diluciones agitadas realizada por Vittorio Elia y Marcella Niccoli del Departamento de Fisicoquímica de la Universidad Federico II de Nápoles, Complejo Universitario de Monte Sant'Angelo, Nápoles, Italia (65). El objetivo de este experimento fue precisamente examinar si las diluciones-agitadas pudieran alterar las propiedades fisicoquímicas del agua empleada como solvente.

Se prepararon dilución sucusionadas (1/100) en agua, de varias sustancias químicas como cloruro de sodio, ácido acético indol 3, ácido diclorofenoxiacético y N-fosfonometil-glicina; las diluciones fueron llevadas hasta la 30CH se analizó la respuesta calorimétrica a 25°C para detectar cambios fisicoquímicos. Los resultados evidencian que llegando a la 30CH hay una mayor liberación de energía exotérmica en las sustancias diluidas y sucusionadas frente al control (66-69). También se midió la conductancia eléctrica y el pH de las diluciones sucusionadas, encontrándose una mayor conductividad eléctrica y un pH as alto que el control (70,71).

Otro estudio que busca determinar si hay cambios en una serie de soluciones hidroalcohólicas como resultado de la dinamización, es el que realiza Casaroli con espectrofotometría infrarroja y transformada de Fourier (72). Se analiza la imagen espectral de alcohol al 70% diluidos en serie hasta 1/100, y 1/100 a la 30, sin y con sucusión en cada etapa, y con acetona o sin acetona como soluto en cada caso. Se pudo observar que en las diluciones solo de alcohol 70%, las que no recibieron sucusión no manifestaron diferencia significativa en sus curvas espectrales, las agitadas si presentaron cambios significativos ($p < 0.05$). En las diluciones a partir de acetona, hubo cambios significativos ($p < 0.05$) en los espectros de todas las diluciones, particularmente evidentes en las dinamizadas. El estudio muestra cambios moleculares significativos en la estructura interna del solvente en diluciones altas, especialmente a nivel de radicales CH_2 y CH_3 , pero también en OH (72).

Cuando se observa la respuesta obtenida en la linfoproliferación dependiente de las dinamizaciones homeopáticas de *Phytolacca americana* se puede afirmar que no hay una relación directa entre la potencia y la actividad mitogénica, sin embargo a pesar que no podemos aseverar esta afirmación con solo tres potencias homeopáticas, podría corresponder con lo que algunos autores han observado en experimentos en los que en diferentes dinamizaciones se puede observar una relación dosis efecto que alterna entre la inhibición, inactividad y estimulación, generando una curva pseudosinusoidal (73,74); se tendría que realizar un estudio mas amplio con otras dinamizaciones para poder realizar esta afirmación.

El estudio más representativo de esta relación dosis efecto alternante es el realizado por Benveniste y cols. en el cual se explora el efecto de series de diluciones centesimales de Factor Activador de Plaquetas y de histamina sobre la degranulación de basófilos, encontrando que la intensidad de la actividad inhibidora de las diluciones centesimales de histamina tiene un ritmo periódico (52). Este experimento mostró que algunas diluciones permanecen regularmente activas, mientras que otras están constantemente inactivas, de tal manera que esta regularidad en la repartición de esta actividad inhibitoria permite una modelización matematica del fenómeno (75).

Por otra parte, los resultados obtenidos en este experimento, relacionados con el efecto linfoproliferativo de la *Phytolacca americana* pueden ser evaluados desde la mirada de la homeopatía como el efecto que produce cualquier sustancia diluida y sucusionada sobre un individuo sano (tomando como individuo en este caso a cada una de las células), a este fenómeno se le designa como patogenesis 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 (76).

Cuando se lee la totalidad de los síntomas que se producen en la experimentación patogenética de *Phytolacca americana*, tal como se describió previamente en el marco teórico, se puede ver que uno de los principales territorios de manifestación sobre el individuo, es el sistema glandular y linfático, especialmente el terreno de amígdalas y de los ganglios linfáticos de la región cervical, en los que se presenta

un crecimiento o hipertrofia de los mismos; estos hallazgos se correlacionan directamente con los encontrados en este experimento desde el punto de vista celular, en el que se muestra un incremento sobre la mitogénesis de las células mononucleares.

Uno de los principios más importantes de la homeopatía es la ley de la semejanza formulada por Samuel Hahnemann en la que se expresa 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 (3); se puede afirmar también que la célula es la unidad funcional y estructural de cualquier organismo vivo (77) y que como tal cada célula representa una individualidad; de esta manera podríamos extrapolar este concepto de individuo cuando se hace exploración patogenética sobre cultivos celulares y se evalúa el efecto sobre cada una de las células y sobre el grupo celular en su totalidad.

Partiendo de este concepto se puede entender desde el razonamiento homeopático a partir de la ley de la semejanza, cómo cuando actuamos sobre células a las que previamente se les ha estimulado en su mitogénesis como por ejemplo en el experimento realizado con phytohemaglutinina (potente inductor de mitogénesis) y que luego han sido expuestas a *Phytolacca americana* en dinamizaciones 7CH y 15CH se ha generado un efecto inhibitorio sobre la linfoproliferación (36,37).

Esta misma hipótesis se puede aplicar sobre el reciente estudio de los efectos citotóxicos de remedios ultra diluidos sobre células de cáncer de seno (40), en el que se muestra como sobre células humanas de adenocarcinoma de seno, o sea células con un efecto mitogénico incrementado (“individuos enfermos”), posterior al uso de *Phytolacca americana*, así como de otros medicamentos, se presenta una inducción de la apoptosis con un consecuente efecto citotóxico.

A partir de esta ley de la semejanza y los hallazgos desde los resultados mostrados a nivel celular presentados en este estudio se puede encontrar una correlación desde el efecto clínico que se presentó en el caso del paciente con enfermedad de Rosai Dorfman quien recibió *Phytolacca americana* 7CH con reversión total hasta la fecha de su enfermedad (9).

Otro de los resultados bastante significativos fue el obtenido al realizar las mediciones de las interleuquinas frente a la exposición a la *Phytolacca americana*, en el que podemos apreciar claramente una inhibición en la producción de TNF- α , IL6 e IL10.

Como ya se ha expresado previamente en el texto, se sabe que la activación de una célula no sólo se manifiesta mediante su capacidad de proliferación frente a un estímulo antigénico, sino que se acompaña en la mayoría de los casos de un proceso de diferenciación mediado por agentes solubles como citoquinas, en nuestro experimento, esta segunda hipótesis se cumple; sin embargo lo interesante de estos hallazgos, es que la acción patogenética de la *Phytolacca americana* en ultra altas diluciones genera un efecto inmunosupresor selectivo a nivel de mediadores proinflamatorios como TNF- α e IL6 y de citoquinas reguladoras como IL10.

Para intentar dar explicación a tan relevante resultado, es necesario revisar un poco los estudios previos que se han hecho referentes a la expresión de algunas citoquinas frente a la exposición a *Phytolacca americana* o de uno de sus principales mitógenos conocidos, el pokeweed.

En un ensayo realizado con macrófagos peritoneales de ratones, se midió la producción de TNF- α posterior a la administración parenteral de Polisacárido I de *Phytolacca acinosa*, encontrándose una inducción significativa sobre la liberación de éste así como de la actividad antitumoral (78).

En otro estudio donde se evalúa la respuesta de producción de citoquinas por mononucleares leucocitos de porcinos estimulados por mitógenos, se evaluó la producción de IL1, IFN- γ y TNF- α posterior a la exposición de pokeweed, uno de los principios activos más importantes de la *Phytolacca americana*, encontrándose que la producción de IL1 se incrementaba considerablemente, mientras que la de IFN- γ fue de un grado mucho menor, al igual que la respuesta de liberación con TNF- α (79).

También en la revisión de la literatura, el pokeweed, mitógeno más importante de *Phytolacca americana* ha mostrado diversos efectos sobre el sistema inmune, incluyendo la estimulación de la producción de dos citoquinas, IL1 y TNF- α (80).

Nuestro propio estudio nos sirve como base para observar como se comportan los linfocitos T frente a la exposición del mitógeno pokewed, apreciando como es significativa la elevación en la producción de IL 10 y TNF- α .

En la homeopatía se habla del principio del efecto inverso o teoría de la hormesis, que sugiere que dosis distintas de toxinas tienen efectos distintos y a veces opuestos, a veces estimulantes y a veces inhibidores (7); es decir que los efectos generados por sustancias que en tintura madre poseen una acción tóxica como en nuestro caso el pokewed, son revertidos por la misma sustancia en altas diluciones sucesionadas. Esta hipótesis se ha visto corroborada en diferentes experimentos de los cuales ya se han mostrado algunos en el marco teórico (19,20).

Otros estudios representativos de esta premisa son por ejemplo, los realizados en ratas a las que se les administra arsénico y un trazador radiactivo y posteriormente se les inyecta *Arsenicum álbum* intraperitoneal en diferentes dinamizaciones (5CH, 7CH, 9CH, 11CH, 13CH, 15CH, 17CH, 19CH, 21CH, 23CH, 25CH, 27CH, 29CH, 31CH) y se aprecia que algunas dinamizaciones (9CH, 11CH, 13CH, 15CH, 17CH y 19CH) aumentan significativamente la eliminación de arsénico por orina y heces. Este efecto protector de las altas diluciones de arsénico desaparecen al someterse a 120°C durante 30 min, lo que indica que es un efecto físico y no químico (81,82).

En otro estudio similar, se aprecia un efecto protector y de reducción de la mortalidad significativo de las altas diluciones sucesionadas de *Mercurius corrosivus* 9c y 15c, frente a una mortalidad elevada causada por la toxicidad de dosis medianas a altas de HgCl₂ (83).

En los hallazgos de este estudio se pueden extrapolar estos resultados al apreciar cómo se disminuye la producción de tres citoquinas por la *Phytolacca americana* en diferentes dinamizaciones, cuando en dosis ponderales uno de sus principales principios activos, el mitógeno pokewed, aumenta dicha producción de estas mismas citoquinas.

Pero no solo se puede basar en este principio para dar explicación a este hallazgo, también es importante ver como cuando los principios de la homeopatía han sido examinados (16); a nivel de laboratorio los resultados se relacionan

también con el efecto inmunoestimulador por ultra bajas dosis de antígenos; regulación de procesos inflamatorios agudos y crónicos y el uso de preparaciones homeopáticas en agricultura.

Aunque no es claro en un modelo in vitro poder evaluar el efecto inmunoregulador de las células sobre todo un sistema neurológico, inmune y endocrino, se deja abierta la posibilidad a experimentar sobre modelos animales que permitan esclarecer este hallazgo que de por si ya está demostrando la actividad biológica de las altas diluciones de *Phytolacca americana* sobre un modelo in vitro.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Desde principios del siglo XX se ha intentado buscar un soporte científico firme al efecto de la homeopatía, es ahora que gracias a los aportes de diferentes disciplinas como la física, la bioquímica, las matemáticas y los distintos métodos de análisis experimental se ha podido empezar a vislumbrar el efecto de las altas diluciones homeopáticas

Mediante la realización de este ensayo experimental, se puede demostrar que *Phytolacca americana* en las dinamizaciones 6CH, 15CH y 30CH poseen un efecto mitogénico evidenciable por el efecto de linfoproliferación que producen sobre poblaciones de PBMCs cultivados in vitro.

El efecto linfoproliferativo de las dinamizaciones de *Phytolacca americana* no tiene un efecto lineal dependiente de la dilución del medicamento.

El mecanismo de la agitación o sucusión es relevante en la preparación del medicamento homeopático para poder generar una acción biológica, en este caso en particular para generar una actividad biológica de linfoproliferación.

Phytolacca americana en dinamizaciones 6CH, 15CH y 30CH genera un efecto inmunosupresor selectivo sobre TNF- α , IL6 e IL10 en PBMCs cultivados in vitro.

Modelos biológicos como el del presente trabajo presentan resultados concretos del efecto del medicamento homeopático, aunque quedan abiertas las puertas de la investigación subsecuente para encontrar explicación a todos los hallazgos encontrados, especialmente los relacionados con el efecto inmunosupresor o inmunomodulador de *Phytolacca americana*, así como el estudio de las tres dinamizaciones con plena sucusión o en completa ausencia de la misma, para revalidar el valor de la sucusión en la terapéutica homeopática.

9. REFERENCIAS

- 1 . Perez R. *De la magia primitiva a la Medicina Moderna*. USA: Fondo Cultura Economica; 2001.
2. <http://gateway.nlm.nih.gov/gw/Cmd?GMMTSearch%26loc=lhc>. (s.f.).
3. Hahnemann S. *Organon del Arte de curar*. México: Ed.Porrúa; 1990.
4. Elia V., Niccoli M. Thermodynamics of Extremely Diluted Aqueous Solutions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999; 879: 241-248
5. Bellavite P., Signorini A. *Homeopathy: a Frontier in Medical Science*. Experimental Studies and Theoretical Foundations. Berkeley California: North Atlantic Books; 1995.
6. Kurz C. *Imagine Homeopathy*. A Book of experiments, Images, and Metaphors. New York: Ed. Thieme; 2005.
7. Owen D. *Principios y práctica de la Homeopatía*. El proceso terapéutico y curativo. España: Elsevier; 2009.
8. Shang A, Huwiler-Müntener K, Nartey L, Juni P, Dorig S, Sterne JA, et al. Are the clinical effects of homoeopathy placebo effects? Comparative study of placebo-controlled trials of homoeopathy and allopathy. *Lancet*. 2005; 366:726–32
9. Benitez G. Archivo Historia Clinica-Enfermedad de Rosai Dorfman. Bogotá; 2002
10. Hernández M., Garrido F. y Moreno S. Diseño de Estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México*. 2000; 42: 144-154
11. Guajardo G. Tres Etapas de la Investigación Homeopática. Homeopatía Global. Disponible en :
http://www.homeopatiaglobal.com.ar/novedades_en_homeopatia.php?archivo=24-09-2007-_03-34.txt
12. Poitevin B, Davenas E, Benveniste J. In vitro immunological degranulation of human basophils is modulated by Lung histamine and Apis mellifica. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1988; 25: 439-444

13. Belon P, Cumps J, Mannaioni PH, Sainte-Laudy J, Roberfroid M, Wiegant FAC. Inhibition of human basophil degranulation by successive histamine dilutions: results of a European multicentre trial. *Inflammation Research* 1999; 48: Supplement 1: 17-18
14. Lalanne MC, Doutremepuich C, De Seze O, Belon P. What is the effect of acetylsalicylic acid at ultra low dose on the interaction platelets/ vessel wall. *Thrombosis Research* 1990; 60: 231-236
15. Doutremepuich C, De Seze O, Le Roy D, Lalanne MC, Anne MC. Aspirin at very ultra low dosage in healthy volunteers effects on bleeding time, platelet aggregation and coagulation. *Haemostasis* 1990; 20: 99-105
16. Bellavite P., Signorini A. Homeopathy. A Frontier in medical science. Berkeley,CA: North Atlantic Books; 1995.
17. Wurmser, L.. Mobilisation de l'arsenic fixé chez le cobaye, sous l'action de doses infinitesimales d'arseniate de sodium. *Thérapie*; 1955; 10: 625.
18. Bildet, J. A., & Gomez, H. Resistance de la cellule hepatiche du rat après une intoxication infinitesimal au tetrachlorure du carbone. *Homeopathie Francaise*. 1981; 72:211
19. Cambar J, Barroulillet MP, Delbancut A. Protective effects of cytotoxic cadmium. *Proceedings of the 52 Liga Medica Homeopatica International* 1997: 157-163
20. Netien G, Graviou E, Marin M. Action de doses infinitesimales de sulfate de cuivre sur des plantes prealablement intoxiquées par cette substance. *Annales Homeopathique francaises* . 1965; 7:248-252.
21. Benítez G. Exploración del efecto de altas diluciones sucusionadas (Medicamento Homeopático) de *Phytolacca americana* sobre linfocitos humanos. Fase I (Trabajo de grado). Bogota. Universidad Nacional de Colombia. 2009
22. Endler PC., O. M. Ultra high dilution. Hormesis: dose-dependent reverse effects of low and very low doses. Kluwer academic publishers; 1994: 209-14

23. Bastide, M.; Daurat, V.; Doucet-Jaboeuf, M.; Pelegrin, A.; Dorfman, P. Immunomodulatory activity of very low doses of thymulin in mice. *Int. J. Immunotherapy*. 1987; 3: 191-200.
24. Bentwich Z., Weisman Z., Topper R., Oberbaum M. Specific immune response to high dilutions of KLH; transfer of immunological information. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*. 2006; 3: 171-186.
25. Davenas E., Poitevin B., Benveniste J. Effect on mouse peritoneal macrophages of orally administered very high dilutions of silica. *European Journal of Pharmacology*. 1987; 135: 313-18.
26. Reilly DT., Taylor MA. Is homeopathy a placebo response? Controlled trial of homeopathic potency with Pollen in hayfever as model. *The Lancet* 1986; 881-886.
27. Bellavite P, Conforti A, Pontarollo F, and Ortolani R. Immunology and homeopathy 2. Cells of the immune system and inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006; 3: 13-24.
28. Conforti A, et al. Citocinas y los niveles de óxido nítrico en un modelo de rata de la protección inmunológica de la artritis inducida por adyuvante *Int J Immunopathol Pharmacol* 2001; 14: 153-60
29. Bellavite P, Ortolani R. and Conforti A,. Immunology and Homeopathy. 3. Experimental Studies on Animal Models. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006;3: 171–186
30. Pitari G. Validación, Metodología y perspectivas. Investigación Científica en Medicina Homeopática. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2007; 4: 271-273
31. El método experimental homeopático. Experimentacion Pura. Homeopatía para todos. Disponible en: <http://homeopata.org/lang/es/investigacion-investigacion/el-metodo-experimental-homeopatico/>
32. Comisión permanente de los estados unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México: D.R. primera edición Instituto Politecnico Nacional Altres Costa-amic; 1998.

33. Rzedowski G., Rzedowski J. Notas sobre el género *Phytolacca* (*Phytolaccaceae*) en Mexico *Acta Botanica Mexicana* 2000, 53: 49-66
34. Yokoyama K, Y. O. Purification and biological activities of pokeweed (*Phytolacca americana*) mitogens. *Bioch Biophys Acta*. 1976; 427: 443-52.
35. Sussner U, A. G. Lehrstuhl für Biologie. *Planta Med*. 2004; 70: 942-7
36. Colas, H., Aubin, M., Picard, Ph., Lebecq, J.C. Inhibition du test de transformation lymphoblastique (TTL) á la phytohemagglutinine (PHA) par *Phytolacca Americana* en dilution homéopathiques. *Ann. Hom. Fr.* 1975; 17 (6): 629
37. Bildet, J., Dupont, H., Aubin, M., Baronnet, S., Berjon, J.J., Gomez, H., Manlhiot, J.L. Action in vitro de dilutions infinitésimales de *Phytolacca Americana* sur la transformation lymphoblastique á la phytohemagglutinine. *Ann. Hom. Fr.* 1981; 23 (3): 102
38. Bellavite P, Signorini A. *The emerging science of homeopathy. Complexity, biodynamics, and nanopharmacology*. United States of America. North Atlantic Books. 2002: 71-72
39. Bonavida B. Efectos inmunomoduladores de dos preparados homeopáticos. En: *Investigación en homeopatía*. Publicaciones y comentarios. Francia: Editions Boiron; 1999.
40. Frenkel M, Mishra BM, Sen S, Yang P, Pawlus A, Vence L, Leblanc A, Cohen L, Banerji P, Banerji P. Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells. *Int Jour of Onc* 2010: 36; 395-403
41. Vijnovsky B. *Tratado de materia médica*. Buenos Aires: Ed Buenos Aires; 1981
42. Nash, P. *Materia Médica on line*. Disponible en: <http://www.homeoint.org/site/deepak/nash.htm>
43. Kent J. *Lecciones de Materia Médica Homeopática*. India: B Jain Publishers Ltd.; 2003.
44. Lathoud. *Materia Medica Homeopática*. Buenos Aires: Ed Albatros; 1989

45. Jouanny J. *Terapeutica Homeopática*. Paris: Ed. L. Boiron; 1997.
46. Ferrer, R. A., Fuster, A., Jimenez, A., Ramos, M., Del Campo, J., Agulles, M., Viel, J. Enfermedad de Rosai-Dorfman (Histiocitosis sinusal con linfadenopatías masivas). *Acta Otorrinolaringol Esp* 2003; 54: 384-387
47. Quezada, E., Escobar, G., Castrejón, M., Gorraez, M., Guido, R., Vargas, M. Enfermedad de Rosai-Dorfman (histiocitosis sinusoidal con linfadenopatía masiva): comunicación de un caso y revisión de la bibliografía. *Revista Alergia México* 2008; 55(5): 206-11
48. Dorland S, D. R. *Diccionario enciclopédico ilustrado de Medicina*. España: Elsevier; 2005.
49. Robbins S., et al. *Patología humana*. 7ª Edición. España: Elsevier; 2006
50. Taleisnik S. Receptores celulares y la transducción de señales. *Temas de Biología Celular*. 1ª Edición. Córdoba: Encuentro Grupo Editor. 2006
51. Endler, P.C. *Homeopathy Research-An expedition Report* . An Old healing System gains Plausibility. Austria: 2003. Disponible en: edition@inter-uni.net.
52. Davenas, E., Beauvais, A., Oberbum, R., Miadonna, A., Tedeschi, A., pomeranz, B., Fortner, P., Belon, P., Sainte-Laudy, J., Poitevin, B. and Benveniste, J. Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE. *Nature*. 1988; 333: 816-8.
53. Madox J., Randi, J. and Stewart. W. High dilution experiments a delusion. *Nature* 1988; 333: 287.
54. Demarque D., *Farmacología y Materia medica homeopática*. Paris: CEDH. 2006: 695
55. Bodger M P, McGiven, and Fitzgerald P H. Mitogenic proteins of pokeweed. II. The differentiation of human peripheral blood B lymphocytes stimulated with purified pokeweed mitogens (Po-2 and Po-6) from pokeweed, *Phytolacca octandra*. *Immunology* 1979; 37: 793

56. Weksler ME, Kuntz MM. Synergy between human T and B lymphocytes in their response to phythaemagglutinin and pokeweed mitogen. *Immunology*. 1976;31(2): 273–281.
57. Bodger M P, McGiven, and Fitzgerald P H. Mitogenic proteins of pokeweed. I. Purification, characterization and mitogenic activity of two proteins from pokeweed (*Phytolacca octandra*). *Immunology* 1979; 37: 785
58. Guajardo G. *Homeopatía Académica. Modelos Explicativos*. Disponible en: <http://homeopatiaacademica.webs.com/>
59. Reséndiz J. Acción de Bufo rana sobre la dopamina cerebral. Temas de Investigación en Homeopatía. Mexico: Propulsora de Homeopatía Eds. 1991
60. Sukul NC, Paul A., Sinhababu SP. Hypothalamic neuronal responses of rats to homeopathic drugs. Editrice Compositore, Bologna. *Omeomed* 1993; 92: 1.
61. Guajardo G, Modelos biocibernéticos para explicar la curación homeopática. Ponencia presentada en el LXI Congreso Panamericano de Medicina Homeopática. y XXXVIII Congreso Nacional de Medicina Homeopática. México, D.F. 2007
62. Landa, V., Rodríguez, R., Jimenez, E., García, N., Molina, L. Espectrofluorimetría de los medicamentos homeopáticos. *Temas de Investigación en homeopatía*. División editorial propulsora de homeopatía. Mexico: 1984.
63. Louis Rey, Thermoluminescence of ultra high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. *Physica EA* 2003; 323: 67-74.
64. Demangeat JL, Demangeat C, Gries P, Poitevin B. Constantinesco A. Modifications des temps de relaxation RMN a 4MHz du solvant dans les tre hautes dilutions salines de silice/lactose. *J Med Nucl Bioph*. 1992; 16: 135-45
65. Elia, V y Niccoli, M. Examinando la Termodinámica en diluciones agitadas. Homeopatía Ahora. Ciencia Experimental. Disponible en: <http://homeopatiaacademica.webs.com/cienciaexperimental.htm>

66. Elia V, Elia L, Cacace P, Napoli E, Niccoli M, Salvatorese F. Extremely diluted solutions as multi-variable systems. *J. Thermal Analysis and Calorimetry* 2006; 84: 317-323
67. Elia V, Niccoli M. New Physico-Chemical Properties of Water Induced by Mechanical treatments. A calorimetric study at 25°C. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2000; 61: 527-537
68. Elia V, Niccoli M. Thermodynamics of extremely diluted aqueous solutions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999; 879: 241-248.
69. Elia V, Niccoli M. New Physico Chemical properties of extremely diluted aqueous solutions. XXIV National Meeting of Calorimetry and Thermal Analysis, Diciembre. 2002
70. Elia V. New physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2004; 75: 815-36
71. Elia V. Marchese M. Montanino M. Napoli E, Niccoli, M. Nonatelli L, Ramaglia A. Hydrohysteretic Phenomena of “Extremely Diluted Solutions” Induced by Mechanical Treatments: A Calorimetric and Conductometric Study at 25 C *Journal of Solution Chemistry*. 2005; 34: 947-960
72. Casaroli RP. Cambios infrarrojos en soluciones dinamizadas *Revista Homeopática Buenos Aires*. 1990; 38: 5-12
73. Walach, H., Jonas, W., Ives, J., Van W. R. and Weingartner, O. Research on Homeopathy: State of the Art. *Jour Alt and Comp Med*. 2005; 11(5): 813–829
74. Bellavite P, Signorini A. *The emerging science of homeopathy. Complexity, biodynamics, and nanopharmacology*. United States of America. North Atlantic Books. 2002: 66-68
75. Sainte-Laudy J., Cherruault Y., Papapanayotou C. Analyse mathématique et modelisation du test de degranulation. *Bio-Science* 1987; 5(6): 210-214
76. Fundación Instituto Colombiano de Homeopatía Luis G. Paez. *Doctrina Homeopática*. Bogotá: Ed. Comité publicaciones de la FICH. 2005: 92

77. Pocock, G and Richards C. *Fisiología Humana – La Base de la Medicina. 2 Edicion.* México; Ed. Mason: 2005
78. Zhang JP, Qian DH. Antitumor activity and tumor necrosis factor production of *Phytolacca acinosa* polysaccharides I in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1993;14(6): 542-5.
79. G. Raskova, F. Kovaru, J. Bartova. Cytokine Production by Porcine Mononuclear Leukocytes Stimulated by Mitogens. *Acta Vet. Brno* 2005, 74: 521–525
80. National Institutes of Health. *Alternative Medicine: Expanding Medical Horizons.* A report to the National Institutes of Health on Alternative Medical System and Pratices in the United States. Chantilly, Virginia. Sep 14-16, 1992: 168
81. Cazin JC, Cazin M, Gaborit JL, Chaoui A, Boiron J, Belon P, Cerruault Y, Papapanayoutou C. A study of the effect of decimal and centesimal dilutions of arsenic on the retention and mobilization of arsenic in the rat. *Human Toxicology* 1987; 6: 315-320
82. Cazin JC, Cazin M, Chaoui A, Belon P. Influence of several physical factors on the activity of ultra low doses. *Ultra Low Doses.* London; Taylor & Francis 1991:69
83. Cal JC, Larue F, Dorian, Guillemain J, Dorfman P, Cambar J. Chronobiological approach of mercury induced toxicity and of the protective effect of high dilutions of mercury against mercury induced nephrotoxicity. *Liver Cells and Drugs.* 1988: 164; 481-485

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado

Consentimiento informado

**Exploración de la acción del medicamento Homeopático *Phytolacca* sobre poblaciones celulares de linfocitos humanos. Fecha dd ____mm
____aa____**

Un grupo de investigadores de la Universidad Nacional de Colombiaⁱ se encuentra desarrollando un proyecto de investigación con el propósito de determinar la acción del medicamento homeopático *Phytolacca americana* sobre poblaciones celulares de linfocitos humanos.

Para poder efectuar la medición es necesario obtener una muestra de sangre de donantes voluntarios. A partir de dicha muestra se obtendrán poblaciones celulares de linfocitos que serán expuestos al medicamento homeopático y luego serán analizados por citometría de flujo. Una vez se realicen y registren las observaciones no se utilizarán con ningún otro propósito. Estas poblaciones de linfocitos después de utilizadas en el experimento serán manejadas por La unidad de recursos físicos de la Universidad Nacional a través del programa UN ambiente que se hará cargo de la disposición definitiva de los desechos orgánicos y químicos producidos en el presente proyecto.

La participación como donante de células en el estudio es voluntaria y usted puede elegir retirar sus células en cualquier momento sin ninguna motivación. La información recolectada mediante el registro y análisis de las mediciones, será archivada por el grupo investigador garantizando la confidencialidad de la identidad de cada participante, las conclusiones derivadas de la investigación; podrán ser enviadas a una publicación científica o expuestas ante la comunidad médica.

Los riesgos y efectos adversos del procedimiento de punción venosa son:

-Dolor generalmente mínimo mientras se realiza la punción y algunos minutos después.

-Puede aparecer un moretón en el sitio de punción, que desaparecerá en pocos días sin necesidad de tratamiento.

-Puede ser necesario puncionar más de una vez en caso de que no se obtenga la muestra sanguínea adecuada en el primer intento, no se realizaran mas punciones de las que usted autorice.

Le garantizamos que se tomaran todas las medidas de limpieza para evitar una eventual infección. Con su firma hace constar que entiende lo anteriormente expuesto y acepta participar libre y voluntariamente en el estudio.

Nombre _____ Firma _____
CC _____ Tel _____

FIGURAS

Figura 1. Niveles de citoquinas pro y anti-inflamatorias cuantificadas en los sobrenadantes de cultivo de las células expuestas a Pokeweed.

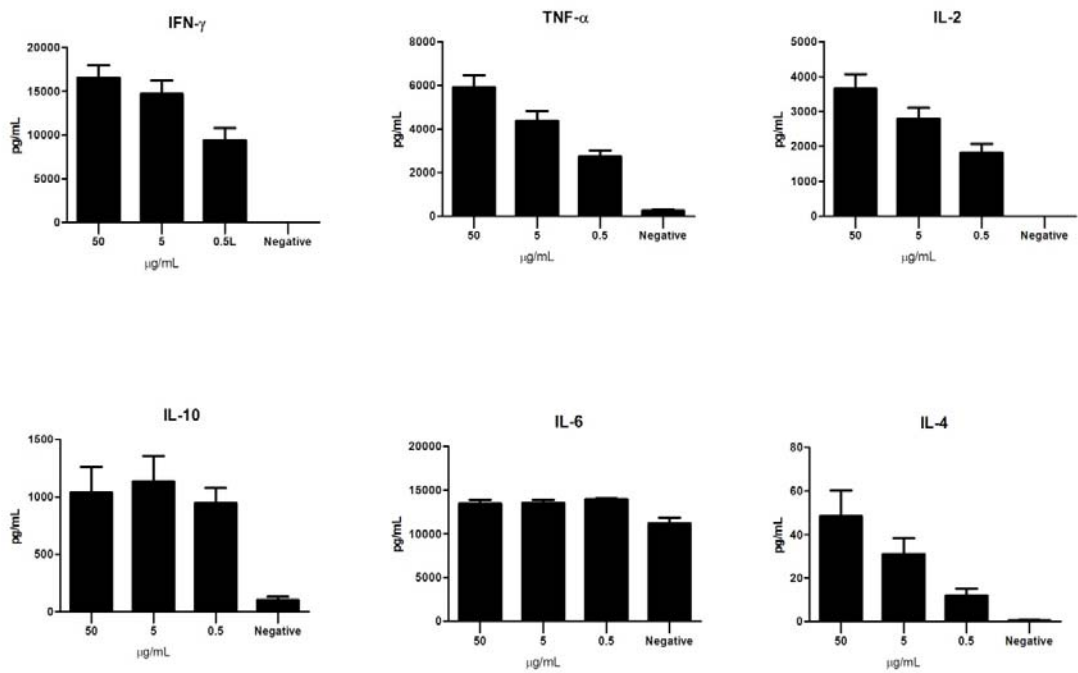


Figura 2. Respuesta de células mononucleares humanas frente al estímulo a ultra altas diluciones de *Phytolacca americana*.

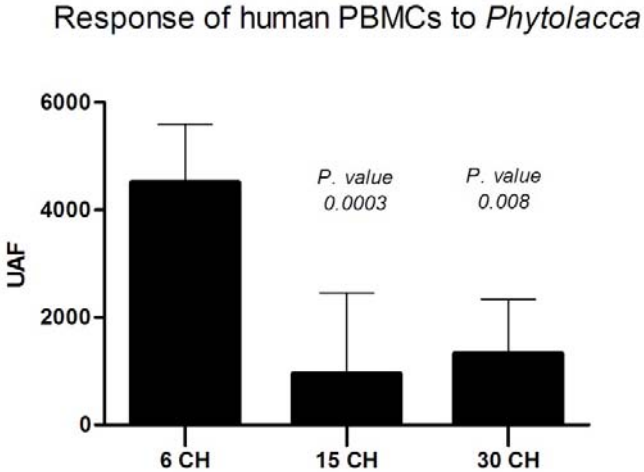


Figura 3. Respuesta de células mononucleares humanas frente a la exposición a ultra altas diluciones de *Phytolacca americana* sucusionadas y sin sucusionar.

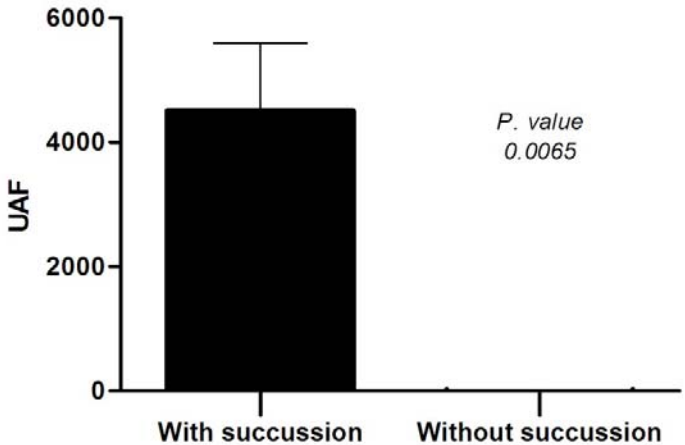
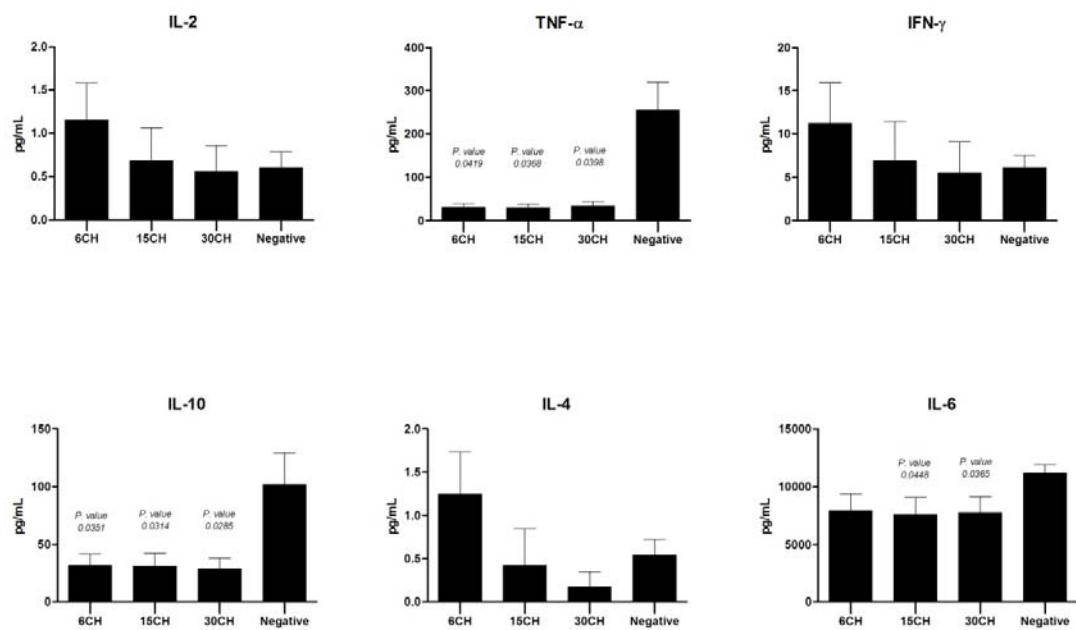


Figura 4. Niveles de citoquinas pro y anti-inflamatorias cuantificadas en los sobrenadantes de cultivo de PBMCs expuestos a ultra altas diluciones de *Phytolacca americana*.



TABLAS

TABLA No. 1. Respuesta mitogénica de mononucleares frente a dinimizaciones de *Phytolacca americana*

	6 CH			15 CH			30 CH			6 CH sin suc		
	UAF	UAF	Promedio	UAF	UAF	Promedio	UAF	UAF	Promedio	UAF	UAF	Promedio
P1	9787	7405	8596	3672	-155	1758,5	-1145	-1499	-1322	-2581	-6655	-4618
P2	3051	8651,5	5851,25	2060	7381,5	4720,75	2471	8669,5	5570,25	-839	891	26
P3	4796	3265	4030,5	1865	968	1416,5	2765	3341	3053	-5197	-1800	-3498,5
P4	3205,5	8091	5648,25	779,5	1967	1373,25	432,5	460	446,25	-1216	-677	-946,5
P5	7408,5	14254	10831,3	9717,5	7102	8409,75	4891,5	5786	5338,75	4841	1103	2972
P6	4291,5	4012	4151,75	979,5	3573	2276,25	3769,5	4827	4298,25	-3903	-3733	-3818
P7	2388,5	3925,5	3157	2210,5	1366,5	1788,5	1279,5	1920,5	320,5	-7277	-9035	-8156
P18	5144	4781,5	4962,75	1511	5816,5	3663,75	4652	4774,5	4713,25	12556	11090	11823
P9	1533	5196,5	3364,75	-49	1869,5	-959,25	111	3121,5	1616,25	156	4191	2173,5
P10	-331,5	-191	-261,25	-3901	-6224	-5062,25	25,5	-710	-342,25	-2275	-1774	-2024,5
P11	-9988	3214,5	-3386,75	-18103	6070,5	-12086,8	-12761	-192,5	-6476,75	-1589	-4008	-2798,5
P12	10833,5	3539	7186,25	6763,5	1341	4052,25	1638,5	-4384	-1372,75	-4682	-6149	-5415,5

TABLA No. 2. Análisis Estadístico de la Respuesta mitogénica de mononucleares frente a dinimizaciones de *Phytolacca americana*

Parameter				
Table Analyzed	Linfop	Linfop	Linfop	Linfop
Column A	6 CH	6 CH	6 CH	15 CH
vs	Vs	Vs	vs	vs
Column B	15 CH	6CH sin suc	30 CH	30 CH
Paired t test				
P value	0,0003	0,0065	0,008	0,7006
P value summary	***	**	**	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Yes	Yes	No

Tabla 3. Analisis estadístico de la Cuantificación de citoquinas (IFN- γ , IL2 e IL4) frente a la exposición de *Phytolacca americana* en diferentes dinimizaciones

Parameter												
Table Analyzed	IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ	IFN- γ	IL-2	IL-2	IL-2	IL-2	IL-4	IL-4	IL-4	IL-4
Column A	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal
vs	vs	vs	vs	Vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs
Column B	6 CH	15 CH	30 CH	6 CH sin suc	6 CH	15 CH	30 CH	6 CH sin suc	6 CH	15 CH	30 CH	6 CH sin suc
Paired t test												
P value	0,3166	0,5	0,852	0,356	0,1173	0,3806	0,5234	0,5282	0,1698	0,9339	0,3876	0,8314
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

Tabla 4. Analisis estadístico de la Cuantificación de citoquinas (TNF- α , IL6 e IL10) frente a la exposición de *Phytolacca americana* en diferentes dinimizaciones

Parameter												
Table Analyzed	TNF- α	TNF- α	TNF- α	TNF- α	IL-6	IL-6	IL-6	IL-6	IL-10	IL-10	IL-10	IL-10
Column A	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal	Basal
vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs	vs
Column B	6 CH	15 CH	30 CH	6 CH sin suc	6 CH	15 CH	30 CH	6 CH sin suc	6 CH	15 CH	30 CH	6 CH sin suc
Paired t test												
P value	0,0419	0,0368	0,0398	0,0504	0,0601	0,0448	0,0365	0,044	0,0351	0,0314	0,0285	0,0306
P value summary	*	*	*	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
