



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Fase IIa - Efecto de *Árnica montana* L.  
homeopatizada en la regulación de citoquinas  
proinflamatorias y antiinflamatorias en  
cultivos celulares de linfocitos t humanos**

**Elba Alicia Torres Lara**

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Maestría en Medicina Alternativa – Homeopatía  
Bogotá, D.C.  
2011**

**Fase IIa - Efecto de *Árnica montana* L.  
homeopatizada en la regulación de citoquinas  
proinflamatorias y antiinflamatorias en  
cultivos celulares de linfocitos t humanos**

**Elba Alicia Torres Lara  
Código: 598021**

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Medicina Alternativa con énfasis en Homeopatía**

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

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Maestría en Medicina Alternativa – Homeopatía  
Bogotá, D.C.  
2011**

Nota de aceptación

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Bogotá, D.C. 2011



*A Dios, por la vida, el amor y la sabiduría.*

*A mis padres por el amor, la paciencia y sus enseñanzas.*

*A mis maestros, por sus enseñanzas y orientaciones en la realización de este trabajo.*



## Resumen

Dado que no existen reportes relacionados con el efecto de *Árnica montana* homeopatizada sobre la respuesta inflamatoria, se realizó este ensayo experimental con el objetivo de explorar el efecto inmunomodulador de *Árnica montana* en diferentes diluciones sucesionadas sobre la producción de IL-1 por poblaciones de Linfocitos T humanos *in vitro*. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica de 10 individuos donantes sanos y se expusieron a seis dinamizaciones de *Árnica montana*, eligiéndose 6, 15, 30, 60, 200 y 1000CH, posteriormente se midió la toxicidad sobre las células y se midieron los niveles de la IL-1. Los resultados obtenidos muestran que no hay una relación directa o lineal entre la potencia y la actividad mitogénica y de modulación de IL-1, sino que hay una respuesta individual que alterna inactividad, inhibición y estimulación.

**Palabras clave:** *Árnica montana*, dinamizaciones homeopáticas, citoquinas proinflamatorias, Interleuquina 1, NF- $\kappa$ B, respuesta inflamatoria.

## Summary

Since there are no reports regarding the effect of homeopathic *Arnica montana* on the inflammatory response, experimental testing was performed in order to explore the immunomodulatory effect of *Arnica montana* in different dilutions succession on the production of IL-1 by T lymphocyte populations human *in vitro*. Were cultured peripheral blood mononuclear cells from healthy donors and 10 individuals were exposed to six potencies of *Arnica montana*, choosing 6, 15, 30, 60, 200, 1000ch then measured the toxicity on the cells and measured levels of IL-1. The results show that there is no direct or linear relationship between power and the mitogenic activity and modulation of IL-1, but there is an individual response that alternates inactive, inhibition and stimulation.

**Key words:** *Arnica montana*, homeopathic potencies, proinflammatory cytokines, interleukin 1, NF- $\kappa$ B, inflammatory response.





# Contenido

	Pág.
Introducción	1
1. Justificación	3
2. Objetivos	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. Marco teórico	7
3.1 El sistema inmune	7
3.1.1 Linfocitos	8
3.1.2 El macrófago: el gran centinela del cuerpo humano	12
3.1.3 Citoquinas: mediadoras de la comunicación intercelular	12
3.1.4 El factor nuclear kappa (NF-κB)	18
3.2 La respuesta inflamatoria	19
3.2.1 Componentes de la respuesta inflamatoria	21
3.3 Homeopatía	23
3.3.1 Definición	23
3.3.2 Estructura o cuerpo de la Homeopatía	25
3.3.3 Dinámica vital o fisiología	26
3.3.4 Doctrina médica	26
3.3.5 Método diagnóstico	26
3.3.6 Método terapéutico	27
3.4 <i>Árnica montana</i>	28
3.4.1 Origen y descripción	28
3.4.2 Patogenesia homeopática de <i>Árnica montana</i>	30
3.4.3 Estudios <i>in vivo</i> y <i>in vitro</i>	35
4 Materiales y metodos	37
4.1 preparacion de formulaciones homeopaticas de <i>Árnica montana</i>	37
4.2 Aislamiento de celulas mononucleares en sangre periferica (PBMC)	37
4.3 Cultivo celular	38
4.4 Evaluación de la viabilidad celular con MTT	38

X Fase IIa - Efecto de *Árnica montana* L. homeopatizada en la regulación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en cultivos celulares de linfocitos t humanos

---

4.5	Cuantificación de citoquinas proinflamatorias – IL-1	39
4.6	Análisis estadístico	39
5.	Resultados	40
5.1	viabilidad celular ante la exposición a diferentes diluciones de <i>Árnica montana</i>	40
5.2	Cuantificación de interleuquina 1 frente a la exposición a arnica montana en diferentes diluciones	40
6.	Discusión	41
7.	Conclusiones	47
	Anexo 1. Consentimiento informado	49
	Bibliografía	53

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
FIG. 1 Viabilidad celular con MTT- <i>Árnica montana</i> a las 48 horas	50
FIG. 2 Viabilidad celular con MTT- <i>Árnica montana</i> a las 72 horas	51
FIG. 3 Efecto <i>in vitro</i> de <i>Árnica montana</i> homeopatizada sobre los niveles de IL-1 $\beta$ en células mononucleares de sangre periférica	52



## Introducción

La Homeopatía, como sistema médico se estableció a finales del siglo XVIII por el médico alemán Samuel Hahnemann, pero desde muchos años atrás el concepto de la similitud ya era conocido. En el siglo V antes de Cristo, Empedocles de Agrigento, observó que en la naturaleza los semejantes se atraían por los semejantes; Hipócrates (460-350 A.C.), considerado en occidente como el padre de la medicina, observó que en la naturaleza existían dos maneras de curar las enfermedades: por el principio de la similitud ("*Similia Similibus Curantur*") o por el principio de los contrarios ("*Contraria contrariis curantur*"). Paracelso (1493-1541) planteo el paradigma de que el hombre no es más que un microcosmos dentro del universo, defendió la idea del vitalismo en la medicina, ya que él consideraba que los medicamentos deberían favorecer ese principio vital y utilizo las dosis mínimas llamando a las enfermedades por el nombre del medicamento con el que podía curarlas. Hahnemann (1755-1843) se considera el verdadero padre de la Homeopatía, ya que el primero en aplicar la ley de la similitud dentro de la clínica, teniendo en cuenta los síntomas de cada paciente (12). Hahnemann experimentó en sí mismo los efectos de la China, la cual le produjo los síntomas que esa misma sustancia solía curar. De ahí comenzó a esbozar el principio de la similitud. A lo largo de su vida, realizo experimentos similares con 103 sustancias derivadas de productos naturales y discernió que la diluciones infinitas de esas sustancias, hechas por pasos y acompañadas de agitación vigorosa (sucusión) en cada paso de dilución, provocaba una potente actividad de estas soluciones (37,44)

La Homeopatía se puede definir como un sistema médico que se caracteriza por ser natural, científico y holístico, que promueve la conservación y recuperación de la salud, aplicando clínicamente el principio de la similitud y utilizando sustancias medicamentosas en dosis infinitesimales (12).

La Homeopatía, basada en los paradigmas "vitalista" y "holístico", puede ser interpretada a través de los conceptos proporcionados por la teoría de los sistemas dinámicos y de la complejidad. Las tres principales propiedades de los sistemas complejos son la no-linealidad, la capacidad de auto-organización y el dinamismo; el análisis de las implicaciones de estas tres propiedades pueden deslumbrar los vínculos entre la teoría de la complejidad y los principios de la Homeopatía (38). Bellavite en su revisión menciona que el punto de partida para comprender la acción de los medicamentos homeopáticos no es el medicamento en sí, sino el cuerpo. Sólo hay que detenerse en mirar los síntomas generados en la experimentación pura de cada medicamento y que

están descritos en la materia medica, para darse cuenta que la Homeopatía se basa en la característica implícita de que el cuerpo es un sistema complejo (38).

El argumento de Hahneman es que el remedio homeopático tiene la posibilidad de extinguir las enfermedades en la medida que sea capaz de causar síntomas similares a la enfermedad natural (37). Éste se prepara a partir de sustancias que son derivadas de los tres reinos de la naturaleza: vegetal, mineral y animal. En la experimentación que hizo Hahnemann en sí mismo y en otras personas sanas, él comprobó la coincidencia que existe entre los efectos tóxicos de los medicamentos dados en grandes dosis por cualquier causa y las observaciones personales cuando se administran en dosis infinitesimales y por eso dedujo que en la toxicidad y nocividad de esas sustancias radica su potencial curativo (37). Sin embargo, el argumento de los escépticos, basado en su enfoque reduccionista, sobre la “inverosimilitud” de la actividad biológica de los medicamentos homeopáticos, por estar diluidos por encima del número de Avogadro y que no permite identificar moléculas por los métodos convencionales, los lleva a ignorar la evidencia positiva que se encuentran en las ciencias básicas, en la pre-clínica y en los estudios clínicos que han demostrado los efectos de los medicamentos homeopáticos tanto *in vivo* como *in vitro* (41).

Dentro de los múltiples medicamentos homeopáticos que existen, se ha elegido a *Árnica montana* dado que ha sido una planta muy utilizada para el manejo de trauma e inflamación desde la antigüedad y en los estudios de los efectos de sus componentes fitoquímicos se ha visto que influye inhibiendo una de las vías más importantes en la generación de la respuesta inflamación, como lo es el factor de transcripción Factor Nuclear kappa (NF-κB).

El presente trabajo quiere contribuir al conocimiento de los mecanismos asociados a la inmunomodulación por compuestos que son empleados en medicina homeopática, como *Árnica montana*, a través de la metodología reduccionista de la investigación actual, que aunque no es la más apropiada para conocer el fenómeno homeopático, dada la diferencia de filosofías, es por el momento la mejor herramienta de la que se dispone y la cual se puede aportar evidencia para construir un nuevo método de investigación que se ajuste más a los lineamientos básicos de la Homeopatía.

# 1. Justificación

Dada la alta incidencia de trauma en nuestro país y en el mundo que provoca daño en los tejidos y que por tanto genera la respuesta inflamatoria en los organismos humanos afectados, es necesario que los médicos conozcamos otras opciones terapéuticas, como lo es el uso de *Árnica montana* homeopatizada, que nos ayuden a manejar y minimizar las lesiones resultantes y sus secuelas, sin generar efectos secundarios o adversos como ocurre con el uso tradicional de los antiinflamatorios no esteroideos, salicilatos y de corticoides, entre otros, que producen daño renal, gástrico, pulmonar, etc. y que en la mayoría de veces afectan la calidad de vida de los pacientes.

*Árnica montana* es una planta que tradicionalmente se ha usado en muchas culturas para el manejo de efectos de trauma como golpes, contusiones, hematomas, torceduras, dolores como magulladura entre otros (25,27,28,33); signos que se manifiestan en los pacientes sanos que han sido estudiados en la experimentación pura de esta sustancia y por tanto, bajo el principio de la similitud de la Homeopatía, se considera útil su uso en el manejo médico de los pacientes que han padecido traumatismos agudos o cuadros dolorosos similares a la sintomatología clínica descrita en la patogenesia del *Árnica montana* (24).

En los diferentes estudios realizados de esta planta se han descubierto sus componentes fitoquímicos, que actúan modificando la respuesta inflamatoria inhibiendo la vía del Factor Nuclear Kappa y por ende la producción de citoquinas proinflamatorias (7, 8, 9, 30). No existen estudios que se hayan realizado con el uso de *Árnica montana* homeopatizada y por esto se desarrollo este estudio *in vitro* para describir sus efectos inmunomoduladores sobre la IL-1 en diferentes diluciones, aplicando así uno de los principios de la Homeopatía y posteriormente correlacionarlos con los estudios *in vitro* realizados con los extractos fitoquímicos de la planta.





## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general:**

Estudiar la respuesta inmunomoduladora *in vitro* de *Árnica montana* homeopatizada sobre la interleuquina 1 en un cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Estudiar mediante el método de Elisa el efecto inmunomodulador de diferentes diluciones dinamizadas de *Árnica montana* sobre la expresión de la interleuquina 1
- Evaluar la viabilidad celular con la exposición al medicamento homeopático *Árnica montana* en las diluciones 6CH, 15CH, 30 CH, 60CH, 200CH y 1000CH.



## 3. Marco teórico

### 3.1 El sistema inmune

El origen la palabra inmunidad deriva del término latino *immunis*, que significa “exento”, que significa el estado de protección contra enfermedades infecciosas (1,2). La inmunología surgió cuando se observó que los sujetos recuperados de algunos procesos infecciosos quedaban protegidos después contra la enfermedad. Quizás la primera referencia escrita sobre la inmunidad se encuentra en Tucídides, gran historiador de las Guerras Peloponesas, quien describe una plaga (peste) en Atenas en el año 430 AC, refiriéndose a que sólo quienes se habían recuperado de esta enfermedad podían cuidar de los nuevos enfermos, porque ya no contraerían este mal por segunda vez (2). Es posible que el concepto de inmunidad haya existido mucho antes, como lo mencionan varios informes sobre la antigua costumbre china, de hacer que los niños inhalaran polvos que eran elaborados a partir de las costras secas dejadas por los enfermos que habían padecido la viruela (1,2).

La inmunidad se define como una reacción a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos y las macromoléculas, como son proteínas y polisacáridos, independiente de cuales sean las repercusiones fisiológicas y patológicas de esa reacción (1). El sistema inmunitario tiene la capacidad de generar una gran variedad de células y moléculas, que actúan de una manera compleja y dinámica para reconocer y eliminar de forma específica un sinnúmero de invasores extraños (2).

La inmunidad tiene dos componentes: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La **inmunidad innata** (llamada también natural o nativa) representa la primera línea de defensa contra la infección o elementos extraños y está constituida por mecanismos existentes antes de que se lleve a cabo la infección, capaces de generar respuestas rápidas a los microorganismos y reaccionan casi que de la misma manera a infecciones repetidas (1,2). Se considera que este tipo de inmunidad tiene cuatro clases de barreras de defensa:

1. Anatómica: piel y superficie de las mucosas,
2. Fisiológica: temperatura, pH, factores solubles como lisozima, interferón y el complemento,
3. Fagocítica: **macrófagos tisulares, monocitos y neutrófilos sanguíneos**
4. Inflamatoria: **citoquinas** (1,2).

La **inmunidad adaptativa** tiene mecanismos de defensa mucho más evolucionados que le generan una gran capacidad, por un lado, para reconocer y eliminar de manera selectiva los microorganismos y moléculas extrañas específicos y por otro, para “recordar” y responder con mayor intensidad a las repetidas exposiciones del mismo microorganismo (1,2). A diferencia de la inmunidad innata, en la inmunidad adaptativa las respuestas no son iguales en todos los miembros de una misma especie, ya que son respuestas a retos antigénicos particulares de cada uno (2). La respuesta adaptativa inicia cuando se da el reconocimiento del antígeno, con la consiguiente activación y proliferación de los linfocitos, quienes al diferenciarse y obtener su función efectora, son capaces de eliminar el patógeno (20).

Existen dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa, la humoral y la celular, las cuales son mediadas por distintos componentes del sistema inmunitario y su función es eliminar cualquier tipo de microorganismo. En la inmunidad humoral participan los linfocitos B, quienes producen los anticuerpos para reconocer específicamente a los antígenos microbianos, neutralizar su infectividad y dirigir su eliminación a través de varios mecanismos efectores, induciendo por ejemplo la fagocitosis o desencadenando la liberación de mediadores inflamatorios por otras células inmunes (1). La inmunidad celular es llevada a cabo por los linfocitos T, quienes atacan a los microorganismos intracelulares (virus y algunas bacterias) que sobreviven y se reproducen en el interior de los fagocitos y por tanto no pueden ser alcanzados por los anticuerpos secretados por los linfocitos B (1).

### 3.1.1 Linfocitos

Los linfocitos son una de las clases de glóbulos blancos que se producen en la médula ósea a través del proceso de hematopoyesis, salen luego hacia la circulación sanguínea y linfática y finalmente residen en los diferentes órganos linfoides. Existen varias subpoblaciones de linfocitos que difieren en su mecanismo de reconocimiento de los antígenos y en sus actividades como células efectoras, siendo las dos principales la población de linfocitos B y la población de linfocitos T (1,2).

Los **linfocitos B** maduran en la médula ósea creando su especificidad a través de reordenamientos aleatorios de algunos segmentos del gen que codifica la molécula del anticuerpo y cuando salen de la medula, cada uno expresa en su membrana un receptor de unión de antígeno único, el cual es una molécula de anticuerpo, con el cual reconocerá determinantes antigénicos conformacionales, como son proteínas, lípidos o carbohidratos de los patógenos extracelulares o de sus productos (2,19). El reordenamiento aleatorio del gen durante el proceso de maduración del linfocito B en la médula ósea también conlleva a la generación de un gran número de diferentes especificidades antigénicas, lo que le confiere a los linfocitos B las cualidades de

especificidad y diversidad (2). Cuando un linfocito B virgen encuentra por primera vez el antígeno que corresponde a su receptor, la unión antígeno-receptor de célula B estimula a la célula para que se divida rápidamente y su progenie se diferencie en células B efectoras o plasmáticas y células B de memoria (2). No obstante, para que un linfocito B sea activado, prolifere y se diferencie a una célula plasmática secretora de anticuerpos necesita de la ayuda de los linfocitos T helper 2 CD4<sup>+</sup> (Th2) a través de las citoquinas interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-10 (IL-10) principalmente (19, 20).

Los **linfocitos T** también se generan dentro de la médula ósea pero a diferencia de las células B, éstos migran al timo para llevar a cabo su proceso de maduración y al igual que las células B, incluye reordenamientos aleatorios de un grupo de segmentos del gen que codifican la síntesis del receptor de unión de antígeno de la célula, llamado *receptor de la célula T (TCR)*, el cual sólo puede identificar los antígenos que estén unidos a unas proteínas de membrana celular llamadas *moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)*, de las cuales existen dos tipos: las moléculas del CMH tipo I que se encuentran en casi todas las células nucleadas y las moléculas del CMH tipo II que sólo se expresan en las células presentadoras de antígeno (2).

Una vez maduran en el timo, los linfocitos T vírgenes o *naive* o Th0 expresan su único receptor de unión de antígeno y la molécula correceptora CD4 o CD8, emigran hacia la circulación en estado de reposo y finalmente se extravasan a los órganos linfáticos secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfático asociado a los sistemas respiratorio, gastrointestinal y genitourinario) donde interactúan con las células dendríticas, con el fin de censar en su superficie la presencia de estructuras antigénicas presentadas por las moléculas del CMH tipo I o II, y si reconocen adecuadamente estos antígenos inician entonces su proceso de activación, expansión clonal y diferenciación a células T efectoras. Estas células efectoras se dividen en tres diferentes subpoblaciones: **células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, células T CD4<sup>+</sup> helper 1 (Th1) y células T CD4<sup>+</sup> helper 2 (Th2)**, que se diferencian de acuerdo al tipo de antígeno presentado por el MCH y a las citoquinas liberadas de forma autocrina y paracrina por las células inmunes en interacción (19). Los antígenos que provienen de patógenos que proliferan en el citosol, como los virus, son ligados por las células presentadoras de antígeno a través del MCH tipo I y presentados a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, ocasionando su activación a células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas. Los antígenos derivados de patógenos que se reproducen dentro del compartimento vesicular o los provenientes de los que son endocitados, son trasladados a la superficie de las células presentadoras de antígeno por el CMH tipo II y presentados a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los cuales, al activarse se diferencian hacia dos perfiles, linfocitos Th1 y linfocitos Th2, que dependiendo de la naturaleza del antígeno y de las citoquinas liberadas por las células presentadoras de antígeno, harán su diferenciación específica y se encargarán de la inmunidad celular y humoral, respectivamente (19).

Este proceso de activación del linfocito T requiere entonces de dos señales. La primera se da por el reconocimiento del antígeno presentado por moléculas del CMH tipo I o II al TCR e incluye también el reconocimiento de los sitios invariantes de las moléculas del

CMH tipo I y II por parte de los correceptores CD8 y CD4, respectivamente, para potenciar la señal de activación generada a través del TCR y permitirle de esta manera al linfocito T su activación frente a bajas concentraciones de dicho antígeno (19). La segunda señal es inducida por la interacción entre las moléculas coestimuladoras CD80/CD86, expresadas en la célula presentadora de antígeno (CPA), y la molécula CD28, expresada en la célula T (19). Adicionalmente, la activación del CD28 induce por un lado, la producción de interleuquina-2 (IL-2) y su receptor de alta afinidad para expandir el clon activado y generar una progenie entre 1.000 y 10.000 células en un lapso de 5 días y, por otro, estimula la síntesis de la proteína antipoptótica Bcl-XL en la célula T para promover la supervivencia de la progenie generada (19).

Luego de la interacción entre el linfocito T y las células presentadoras de antígeno, el TCR inicia las cascadas de señalización que integran también la información de los receptores coestimuladores y las citoquinas disponibles localmente; dependiendo de la duración y de la fuerza de cada paso en la cascada de señalización, se acumulan factores de transcripción a nivel nuclear, como el factor nuclear asociado a linfocitos T (NFAT), el factor nuclear kappa (NF- $\kappa$ B) y la proteína activadora (AP-1), quienes a su vez sinergizan la expresión de cientos de genes cruciales en la activación, proliferación y diferenciación del linfocito hacia un linaje específico (21).

De acuerdo a las interacciones dinámicas entre los factores de transcripción y las regiones promotoras del gen, se generaran citoquinas con efecto paracrino y autocrino, que irán a determinar la expansión clonal y la diferenciación específica hacia células T efectoras o regulatorias. Por ejemplo, la interacción entre NFAT:ADN o AP-1:ADN conllevan a la expresión de IL-2, la cual tiene efecto autocrino, para inducir la expansión clonal de las células T, mientras que la unión NFAT:AP-1:ADN deriva en la sobrerregulación de la interleuquina-12 (IL12), citoquina que es producida por las células dendríticas y macrófagos y es considerada como el estímulo más potente para la diferenciación de las células T hacia el linaje Th1 (19, 21).

En general, la diferenciación de las células T incluye ciertos pasos coordinados en el control del nivel transcripcional:

1. Linaje comprometido: el cual es iniciado en la recién activada célula T a través de citoquinas y reforzado por la inducción de los reguladores transcripcionales para ese linaje dado. Es así como la **IL-12 y el interferón gamma (IFN $\gamma$ )** inducen la diferenciación hacia el perfil **TH1** a través de la activación de factores de transcripción como el **transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) y 4 (STAT4) y T box (T-bet)**, mientras que la **IL-4** activa los factores **STAT6 y GATA3** llevando al desarrollo de células **Th2** (21).
2. Amplificación: ocurre a través de factores de transcripción específicos del linaje comprometido de células T, que inducen una primera ola de expresión de genes que

reforzaran la diferenciación hacia la clase efectora o regulatoria determinada, inhibiendo el desarrollo de un linaje alterno (21).

3. Diferenciación definitiva: se realiza a través de una remodelación global de la cromatina para estabilizar el linaje definitivo, ya sea con función efectora o regulatoria, en el momento en que tenga un segundo encuentro con el antígeno en los tejidos inflamados (21).

Como se menciona anteriormente, la activación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> conduce a dos linajes: Th1 y Th2, los cuales se diferencian por el tipo de citoquinas que producen y por las funciones que median (19).

Las células del linaje Th1 es inducido por las citoquinas IL-12, IL-23, IL-27 e INF $\gamma$ , las cuales son producidas por las células dendríticas, los macrófagos, las células T CD8 citotóxicas y las células NK. Por su parte, las células Th1 producen citoquinas, principalmente IL-2, INF $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ , IL-3 y el factor estimulante de colonias para granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y se encargan de mediar el enfrentamiento con patógenos intravesiculares o endocitados dentro de las vacuolas a través de la activación y potenciación del macrófago, gracias al efecto del INF $\gamma$ , convirtiéndolo en su principal blanco efector, y de esta manera, las células Th1 participan en la generación de la respuesta inflamatoria en los tejidos periféricos (19). También expresan en su superficie receptores para quimiocinas inflamatorias (CCR5 y CXCR3) y ligandos E y P para ser rápidamente reclutadas en el foco inflamatorio naciente.

Las células del linaje Th2 es inducido por la citoquina IL-4, la cual es producida principalmente por las células NK y en los mastocitos (1,19). Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y también IL-3 y GM-CSF en común con las Th1 y su función principal es colaborar con los linfocitos B en los órganos linfáticos secundarios para montar una respuesta humoral eficaz frente a bacterias y parásitos extracelulares, donde los anticuerpos realizan su actividad neutralizante. También a través de la IL-4 y la IL-13 estimula la producción de eotaxina, la cual recluta eosinófilos y mastocitos hacia las mucosas del tracto respiratorio y digestivo, para desarrollar respuestas antiparasitarias y también fenómenos de alergia (19).

La generación de respuestas Th1 y Th2 es mutuamente excluyente, actuando como mecanismo de regulación, ya que el INF $\gamma$  producido por el linaje Th1 inhibe la proliferación de células Th2 y de igual modo, la IL-4 y la IL-10 producidas por las células Th2 inhiben la proliferación de las células Th1 (19).

Tanto las células Th1 como las Th2 pueden activarse en los tejidos periféricos sin requerir de las señales coestimuladoras descritas en la activación de una célula virgen, pero deben reconocer otra vez el mismo complejo antígeno-CMH tipo II que reconocieron inicialmente en el órgano linfático secundario y así, pueden ser activadas por macrófagos, linfocitos B y por células parenquimatosas que puedan expresar en su

superficie moléculas del CMH tipo II, como consecuencia de un fenómeno inflamatorio en curso (19).

### 3.1.2 El macrófago: el gran centinela del cuerpo humano

El monocito-macrófago se origina en la médula ósea a partir de células madres, que posterior a su proceso de diferenciación, producen monocitos, los cuales pasan a la circulación sanguínea, donde pueden permanecer por largos periodos; luego de penetrar al compartimento tisular y madurar se diferencian en macrófagos tisulares (1,6). Durante este proceso de maduración, el macrófago adquiere diversas funciones dentro de las cuales están la de defensa contra microorganismos, de capacidad para iniciar respuesta inmune, producir factores linfocitarios y secretar mediadores que regulan la proliferación, pero la más importante es su capacidad de ingerir todo tipo de material extraño, denominada fagocitosis (1,6).

Los macrófagos suelen localizarse en sitios estratégicos por donde los microorganismos pueden penetrar al huésped, tales como el intersticio de los órganos parenquimatosos, el tejido conjuntivo subepitelial, los senos linfáticos de los ganglios linfáticos y el revestimiento de los sinusoides vasculares del bazo y del hígado (1,6).

Para la activación de los macrófagos se requiere del estímulo de los linfocitos T CD4 y CD8 (estimulados por el antígeno en los tejidos) mediante la producción de CD40L y de IFN- $\gamma$ , siendo esta última la principal citoquina activadora de macrófagos (1). Como respuesta a estos estímulos se activan los factores de transcripción **NF- $\kappa$ B**, AP-1, STAT1 y el factor regulatorio de interferon 1 (IRF-1), que conllevan a la síntesis de mayores cantidades de proteínas, que serán las responsables de las funciones efectoras de los macrófagos (1), tales como las citoquinas proinflamatorias TNF, IL1, IL6, quimiocinas, prostaglandinas y leucotrienos, entre otros (1). Este mismo proceso es desencadenado por diferentes agentes exógenos y endógenos, generando por lo tanto, la respuesta inflamatoria.

Los macrófagos suelen responder a la presencia de microorganismos de una manera tan rápida como lo hacen los neutrófilos, pero permanecen mucho más tiempo en el sitio de inflamación dado que tienen una vida media más larga y a diferencia de los neutrófilos (que tienen un estado de diferenciación terminal), pueden dividirse en la zona de inflamación (1).

### 3.1.3 Citoquinas: mediadoras de la comunicación intercelular

Para que una reacción inmunitaria sea eficaz debe incluir células linfoides (*linfocitos T* y *celulas presentadoras de antígenos*), inflamatorias y hematopoyéticas y quien media las interacciones complejas entre todas estas células son un grupo de proteínas reguladoras



llamadas **citoquinas**, las cuales son proteínas de bajo peso molecular o glicoproteínas secretadas por los células blancas y otros tipos celulares como respuesta a varios estímulos (2).

Las citoquinas son polipéptidos secretados tanto por la células de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa en respuesta a estímulos tanto inflamatorios como antigénicos, uniéndose a sus receptores de alta afinidad que se encuentran en las células diana y por tanto, su principal papel está el mediar y regular las reacciones inmunitarias e inflamatorias (1). Anteriormente la nomenclatura de las citoquinas se basaba en sus fuentes celulares pero debido al descubrimiento de que una misma proteína puede ser sintetizada por diferentes tipos celulares, se adoptó el término general de **citoquinas** (1).

A pesar de que las citoquinas tienen diversidad estructural, comparten una lista de propiedades:

- La secreción de citoquinas es un episodio breve y autolimitado, ya que éstas no se almacenan como moléculas preformadas sino que se sintetizan mediante una nueva transcripción génica siempre que haya un proceso de activación celular, secretándose rápidamente para generar el pico en el momento en que se necesite (1,5).
- Las acciones de las citoquinas son pleiotrópicas y redundantes: en cuanto al pleiotropismo, es la propiedad que tiene una citoquina de actuar sobre diversas clases de células y la redundancia hace referencia a la capacidad que poseen varias citoquinas de ejercer los mismos efectos funcionales (1,5).
- Las citoquinas y sus receptores muestran una afinidad muy alta entre sí, con constantes de disociación dentro del intervalo de  $10^{-10}$  a  $10^{-12}$  M, y como consecuencia, las citoquinas pueden ejercer sus efectos biológicos en concentraciones pico molares (1, 2, 5).
- Las citoquinas con frecuencia intervienen en la síntesis y funciones de otras citoquinas: propiedad que se caracteriza por una cascada en la que una citoquina estimula la producción de otras y estas a su vez median funciones o efectos biológicos de la primera, es decir, pueden antagonizar mutuamente o producir efectos sumativos o incluso sinérgicos (1,5).
- Las citoquinas suelen actuar a nivel local o sistémico, ya sea en la misma célula que la produjo (autocrina), o en una célula cercana (paracrina) y algunas se sintetizan en grandes cantidades para que circulen y realicen sus acciones a distancia (endocrina) (1,5).

- Múltiples señales externas regulan la expresión de los receptores de citoquinas y de este modo poder controlar la capacidad de respuesta de las células a las citoquinas (1, 2, 5).

### 3.1.3.1 Citoquinas proinflamatorias

La respuesta inflamatoria es orquestada por las citoquinas proinflamatorias como son el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), la Interleuquina 1 (IL-1) y la interleuquina 6 (IL-6) (3). Estas citoquinas proinflamatorias juegan un papel como mensajeras intercelulares para iniciar, amplificar y perpetuar la respuesta inflamatoria, ya sea a nivel local o sistémico; tienen además múltiples órganos blanco y actúan, como se describió anteriormente, de forma pleiotrópica (34). En el caso de trauma, en su fase inicial se liberan tanto las citoquinas proinflamatorias como anti-inflamatorias, con el fin de mantener la homeostasis biológica, sin embargo, si la producción predominante es de las proinflamatorias se genera el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) mientras que si el predominio de producción es de las anti-inflamatorias se puede generar inmunosupresión, lo que favorecería el desarrollo de infección y sepsis o el llamado Síndrome de Respuesta Antiinflamatoria Compensatoria (CARS) (34).

Estas citoquinas son, como se mencionó anteriormente, proteínas pleiotrópicas, que regulan la muerte celular en los tejidos alterados, modifican la permeabilidad vascular, reclutan células sanguíneas hacia el tejido afectado y cuando son secretadas en grandes cantidades inducen a nivel hepático la producción de proteínas de fase aguda que luego activarán al endotelio cerebral para la producción de prostaglandinas, como la PGE<sub>2</sub>, que actúa localmente sobre neuronas específicas que promueven síntomas en el paciente como fiebre, anorexia, fatiga, somnolencia, aislamiento social (3,4).

#### 3.1.3.1.1 Interleuquina 1 (IL-1)

De esta interleuquina existen dos formas diferentes: la IL-1 $\alpha$  que tiene un peso de 17kDa y contiene 159 aminoácidos y la IL-1 $\beta$  que pesa 17 kDa y contiene 153 aminoácidos. Son producidas por dos genes diferentes que se encuentran en el cromosoma 2, cerca de donde están los de los receptores de esta interleuquina; se unen al mismo receptor y sus actividades biológicas son muy semejantes (5), aunque la mayor parte de la IL-1 circulante es IL-1 $\beta$  (1).

Se han encontrado dos tipos de receptores de membrana para la IL-1, miembros de la familia de las inmunoglobulinas. El tipo I se presenta en la mayoría de tipos celulares y es considerado como el principal receptor de las respuestas mediadas por la IL-1, generando una señalización altamente eficiente gracias al mecanismo de amplificación a través de múltiples proteín-quinasa (45). Esta unión induce la cascada de activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1. El receptor tipo II se expresa en los linfocitos B e inhibe competitivamente la unión de la IL-1 al receptor de IL-1 tipo I, bloqueando las acciones de la IL-1 $\alpha$  y de la IL-1 $\beta$  y por tanto no se genera señalización intracelular (1).

La IL-1 es una citoquina multifuncional, ya que induce actividad en la mayoría de tipos celulares y es la más importante citoquina proinflamatoria junto con el TNF (45). Al igual que el TNF, la IL-1 actúa en la inmunidad innata, mediando la respuesta inflamatoria del huésped a diferentes estímulos inflamatorios, especialmente a los microorganismos

patógenos. Su principal fuente celular es el fagocito mononuclear activado, pero también es producida por los neutrófilos, linfocitos T y B, las células endoteliales y epiteliales, como respuesta a los estímulos dados tanto por citoquinas como el TNF, el IFN- $\alpha$ , el IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , como por los lipopolisacáridos bacterianos, antígenos, mitógenos y virus (1, 5, 31). Sin embargo, también existen sustancias que disminuyen la producción de la IL-1 como la IL-6, los glucocorticoides, las lipoproteínas, prostaglandina E2, lípidos (5). Tiene una vida media de tan solo 6 minutos pero tiene muchos efectos fisiológicos (36).

Dentro de sus múltiples acciones biológicas, gracias a la habilidad que tiene esta única citoquina en la expresión de múltiples genes, están las siguientes:

- Estimula la expresión de los genes de la oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2) y de la fosfolipasa A2 (PLA2) para producir oxido nítrico, prostaglandina E2 y factor activador plaquetario, respectivamente, los cuales son los principales mediadores de la actividad biológica de la IL-1.
- En concentraciones bajas actúa a nivel local sobre las células endoteliales estimulando la expresión de moléculas de adhesión para atraer a los leucocitos hacia el foco infeccioso (1).
- En concentraciones altas pasa a la circulación sistémica y ejerce efectos endocrinos en conjunto con el TNF, para generar fiebre a nivel hipotalámico, la producción de las proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos e induce los procesos catabólicos que conllevan a la caquexia (5).
- Estimula a los linfocitos T ayudadores, induciendo en ellos la secreción de IL-2 y la expresión de su respectivo receptor. Ambas modulan el comportamiento electrofisiológico de las neuronas y actúan sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (5).
- Estimula a los linfocitos B, promoviendo su proliferación y producción de inmunoglobulinas e igualmente lo hace con las células NK, fibroblastos, timocitos, astroglia y microglia (5).
- Promueve, al igual que el TNF, los procesos trombóticos y mitiga los mecanismos de anticoagulación (5).
- Induce la secreción de otras citoquinas proinflamatorias, incluyendo el TNF e incrementa los niveles de quimioquinas y moléculas de adhesión (36).

- La unión a su receptor lleva a la activación de cascadas de señalización que desencadenan también en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (36).

### 3.1.3.1.2 Factor de necrosis tumoral (TNF)

Esta citoquina fue inicialmente identificada en el suero de animales que habían sido tratados con lipopolisacáridos bacterianos o endotoxinas y que ocasionaba el efecto de necrosis tumoral *in vivo* (1,5). Históricamente se hace referencia al TNF como TNF- $\alpha$  para diferenciarlo del TNF- $\beta$  que es una linfotoxina (5).

El TNF- $\alpha$  es una glucoproteína de membrana tipo II no glicosilada, tiene un extremo intracelular amino terminal y un extremo extracelular carboxi terminal de gran tamaño, con peso de 17kDa, compuesta de 157 aminoácidos, que forma tanto dímeros como trímeros. Posee dos tipos de receptores, uno de 55kD llamado receptor de TNF tipo I (TNF-RI) y otro de 75kD, llamado receptor de TNF tipo II (TNF-RII) (1, 5). Ambos receptores se encuentran en casi todos los tipos de células, sin embargo, la mayoría de los efectos biológicos del TNF son mediados por el TNF-RI, interviniendo en las respuestas inmunes e inflamatorias. El estímulo del TNF-RI por citoquinas lleva a la activación de caspasas y desencadena apoptosis, pero también activan factores de transcripción; la unión de citoquinas al TNF-RII desencadena la activación de factores de transcripción, principalmente del NF- $\kappa$ B y la proteína de activación 1 (AP-1), que desencadenarán luego la producción de citoquinas proinflamatorias, como se vio anteriormente (1, 5,36).

El TNF es considerado como el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente al ataque por bacterias gramnegativas y otros agentes infecciosos y también es el responsable de varias de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves (1). Es producido primordialmente por los fagocitos mononucleares activados (macrófagos), pero también por linfocitos T estimulados por antígeno, por células NK (citocidas naturales), mastocitos, neutrófilos, fibroblastos y células endoteliales (1, 31). De los estímulos más potentes para la producción del TNF por los macrófagos es la presencia de los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gramnegativas, sumado al efecto del INF- $\gamma$  derivado de las células NK y de los linfocitos T, el cual aumenta la síntesis de TNF por parte de estos macrófagos estimulados por los LPS (1).

Su principal función fisiológica es estimular el reclutamiento y activación de neutrófilos y de monocitos para ser llevados a los focos de infección con el objetivo de erradicar los patógenos allí presentes (1). Para lograr esto, el TNF realiza diversas acciones sobre el endotelio vascular y los leucocitos

### 3.1.3.1.3 Interleuquina 6 (IL-6)

La IL-6 es un homodímero con masa molecular de 26 kDa, su receptor consta de una proteína de unión a citoquinas y de una subunidad transductora de señales, activando, entre otras, la vía de señalización JAK/STAT (1, 5).

Es producida por los fagocitos mononucleares, fibroblastos, células endoteliales y células T activadas, en respuesta principalmente a la IL-1, y en menor medida al TNF, pero su síntesis no es inducida directamente por los productos microbianos (1, 5).

Tiene varias acciones tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa:

- Estimula la producción principalmente de fibrinógeno y complementa con la IL-1 y el TNF la síntesis de todo el grupo de proteínas de reacción de fase aguda (1, 5).
- Es considerada como el principal factor de crecimiento de los linfocitos B activados (1, 5).
- Actúa también como coestimulador de las células T y timocitos y como cofactor para otras citoquinas en el proceso de regulación del crecimiento y diferenciación de células madre hematopoyéticas (5).
- Regula el crecimiento y diferenciación de los linfocitos, también activa células NK y neutrófilos (36).
- Aparece más tarde que el TNF y la IL-1, siendo detectada dentro de la hora siguiente al trauma pero tiene una vida media más larga que estas dos citoquinas (36).
- Juega un doble papel en la respuesta inflamatoria, actuando como citoquina tanto proinflamatoria como antiinflamatoria, ya que induce la secreción del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) y del receptor soluble del TNF (TNFR) (36).

### 3.1.4 El factor nuclear kappa (NF-κB)

El factor nuclear kappa – NF-κB es un mediador central de la respuesta inmune humana (10). Es una proteína compuesta por dos subunidades, la p50 y la p65, y se encuentra en el citoplasma de las células como un complejo inactivo al estar unido a la subunidad inhibitoria IκB, la cual luego de múltiples señales entrantes, tanto desde la superficie celular como desde el núcleo (como infecciones bacterianas y virales, citoquinas inflamatorias, estrés oxidativo, drogas genotóxicas, luz ultravioleta, etc.), es rápidamente fosforilada, ubiquitinada y degradada por el proteosoma 26S y de esta manera libera el NF-κB, el cual se transloca al núcleo, donde se une a elementos κB en las regiones promotoras de los genes diana para regular la transcripción de varias citoquinas

inflamatorias como IL-1, IL-2, IL6, IL8 y TNF- $\alpha$ , de ciclooxigenasa II, óxido nítrico sintasa, moléculas de adhesión celular, inmunorreceptores, factores de crecimiento hematopoyético y proteínas de estrés (10,11,16,17,18).

La activación del NF- $\kappa$ B es crucial en múltiples procesos celulares tales como la inflamación, la inmunidad, la proliferación celular y la apoptosis y se realiza por varias vías de señalización, entre cuales están la del receptor 1 de la interleuquina 1 (IL-1R1), la del receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1), el receptor similar a Toll (TRL), el receptor de células B (BCR) y de células T (TCR), entre otros (10,17). Todos ellos convergen en la activación de un complejo llamado I $\kappa$ B-kinasa (IKK), el cual incluye un grupo de proteínas moduladoras del NF- $\kappa$ B denominada kinasas IKK $\gamma$  (NEMO), IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ . Una vez es activado por fosforilación, este complejo fosforila la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B sobre las serinas 32 y 36, seguida de la ubiquitinación y degradación por el proteosoma, permitiendo la liberación del NF- $\kappa$ B (10,17).

Como se mencionó anteriormente, el NF- $\kappa$ B induce la rápida expresión de múltiples genes involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune y también coopera con otros factores de transcripción, como el AP-1, para amplificar la expresión génica (18).

Debido a que las alteraciones en la vías de señalización del NF- $\kappa$ B han sido asociadas a cáncer y enfermedades inflamatorias, se han desarrollado múltiples medicamentos que intervienen en cada paso de este proceso: los glucocorticoides inhiben al NF- $\kappa$ B al unirse directamente a éste o induciendo un aumento en la transcripción del gen de la unidad inhibitoria I $\kappa$ B y así favorecer la retención del NF- $\kappa$ B en el citoplasma ; la ciclosporina evita su activación al inhibir la activación de la calcineurina, una fosfatasa que induce indirectamente la degradación de la proteína I $\kappa$ B; la aspirina y los antiinflamatorios no esteroideos ejercen su acción en diferentes niveles: inhibiendo la actividad de las cinasas IKK, inhibiendo la degradación de la subunidad I $\kappa$ B e interviniendo en la translocación nuclear del NF- $\kappa$ B y en su unión al ADN (10,17,18).

## 3.2 La respuesta inflamatoria

La inflamación es una respuesta protectora que el cuerpo utiliza tanto con el fin de eliminar estímulos perjudiciales como para llevar a cabo procesos de cicatrización y reparación de los tejidos lesionados (3). La inflamación es causada por diversos factores que pueden ser externos (agentes infecciosos, alérgenos, agentes químicos, partículas inertes, agresión física) o internos (infarto cardiaco, depósito de colesterol LDL en la pared de las arteriolas, depósito de complejos inmunes sobre las membranas basales) (3,5). Independiente de la causa, la inflamación ha evolucionado como una respuesta adaptativa con el objetivo de restaurar la homeostasis (15).

Clínicamente la inflamación se caracteriza por cinco síntomas: eritema, edema, calor, dolor y disfunción del tejido afectado, los cuales son el reflejo de la vasodilatación y

---

aumento de la permeabilidad del endotelio vascular que conlleva a la extravasación de componentes séricos y de células inmunes (3, 4,5).

Dentro de las células que participan en la respuesta inflamatoria están los mastocitos, fagocitos mononucleares (macrófagos, monocitos y células dendríticas), polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), linfocitos T, plaquetas, células epiteliales y endoteliales. Sin embargo, los componentes del sistema inmune innato son los mayores contribuyentes a la inflamación aguda inducida por agentes microbianos y por daño tisular (3), ya que el reconocimiento inicial de la infección o del tejido dañado lo realizan los **macrófagos** residentes en los tejidos y los mastocitos, respondiendo con la producción de una variedad de mediadores inflamatorios con el principal objetivo de obtener un exudado inflamatorio local rico en proteínas plasmáticas y leucocitos, principalmente neutrófilos, para llevar a cabo una respuesta inflamatoria aguda exitosa que resulte en la eliminación del agente infeccioso o de las células muertas.

Aunque los macrófagos y las células dendríticas juegan grandes roles en la inmunidad innata, otras células como las células NK, neutrófilos, células endoteliales, las células epiteliales y los fibroblastos también contribuyen a este tipo de inmunidad y pertenecen a la familia de células presentadoras de antígeno.(3). Todas estas células expresan en su superficie un tipo de receptores denominados Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), los cuales son los responsables de detectar , por un lado, la presencia de microorganismos mediante el reconocimiento de estructuras conservadas entre las especies microbianas llamadas Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) y por otro, la presencia de moléculas endógenas secretadas por las células dañadas por trauma, denominadas Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) (3). Los DAMPs son moléculas endógenas que se han denominado “alarminas” y dentro de estas moléculas están las proteínas de choque térmico (HSPs), defensinas, anexinas, la proteína S100 y la proteína nuclear de alta movilidad box 1 (HMGB1), las cuales actúan como señal de trauma tisular o celular e inducen la activación de la respuesta inmune innata (35), siendo la HMGB1 la más importante y activa , ya que no solo actúa sobre los macrófagos y células dendríticas sino que también es necesaria para la expansión clonal, supervivencia y polarización clonal de células T vírgenes (36) y realiza su acción inflamatoria a través de los receptores multiligandos como los receptores Toll-like (TRLs) (34).

En cuanto a los PRRs se han identificado cuatro tipo de familias, las cuales incluyen tanto proteínas transmembrana como los receptores Toll-like (TLRs) y los receptores de lecitina tipo C (CLRs) como proteínas citoplasmáticas las cuales incluyen los receptores del gen del ácido retinoico inducible (RLRs) y receptores NOD-like (3). La detección de estos patrones por los PRRs regula la transcripción de genes que codifican citoquinas proinflamatorias, interferones tipo I (IFNs), quemoquinas y proteínas antimicrobianas y de



esta manera se coordina la eliminación de los agentes patógenos y de las células infectadas o dañadas (3).

### 3.2.1 Componentes de la respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria típica tiene cuatro componentes, que se presentan en múltiples formas y sus combinaciones se dan en función de las diferentes vías inflamatorias, los cuales son:

1. los inductores inflamatorios,
2. los sensores que detectan a estos primeros,
3. los mediadores inflamatorios inducidos por los sensores y
4. los órganos blancos que serán afectados por estos mediadores inflamatorios (4).

Los inductores, por ejemplo las bacterias, inician la respuesta inflamatoria al ser detectados por los sensores, como son los TLRs que están expresados en los macrófagos locales, los cuales se activan e inducen la producción de citoquinas proinflamatorias tales como el **TNF**, **la IL-1 y la IL-6**, de quemoquinas y prostaglandinas; estos mediadores inflamatorios actúan sobre los tejidos blanco, tanto a nivel local sobre los vasos sanguíneos y los tejidos lesionados, en donde inducen cambios en la permeabilidad del endotelio vascular y la expresión de moléculas de adhesión, para reclutar y extravasar neutrófilos, como a nivel sistémico sobre hígado, hipotálamo y médula ósea, para inducir la producción de proteínas de fase aguda, incremento en la temperatura corporal y mayor número de neutrófilos, respectivamente. Los neutrófilos reclutados de la circulación y los macrófagos residentes del tejido y las células del tejido conectivo buscan y destruyen los patógenos invasores (4). Este proceso es apoyado por los componentes plasmáticos tales como los anticuerpos y las proteínas de respuesta de fase aguda (proteína C reactiva, complementos, PRRs humorales, factores de coagulación, entre otros), los cuales actúan sobre diferentes células, tejidos y órganos para coordinar una reacción global de todo el organismo frente a la infección y se manifiestan por una serie de cambios a nivel sistémico en el paciente como son la fiebre, la somnolencia, anorexia y malestar general (4,5,20). El aumento de la temperatura corporal refleja la acción de las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  sobre el termostato hipotalámico mediado por la acción de la PgE2 y favorece la producción de IFN tipo I y la actividad de los polimorfonucleares, células NK y de los linfocitos. A su vez el sueño, que es de onda lenta, posiblemente trata de mantener al organismo en un estado de reposo con el fin de concentrar toda la energía en la aniquilación del agente agresor (5,19). Todos estos efectos innatos buscan incrementar el número de células y moléculas hacia la zona infectada para garantizar su curación y recuperar por ende la homeostasis del organismo mientras se desarrolla la respuesta inmune adaptativa. (20).

Uno de los efectos de la respuesta inflamatoria es el inducir en el endotelio la expresión de moléculas que provoquen coagulación local de la sangre, para favorecer que el patógeno, ya sea libre o englobado por los macrófagos, se dirija por vía linfática hacia los ganglios linfáticos regionales que drenan la zona de infección, donde se hará la

presentación del antígeno a los linfocitos T por parte de los macrófagos o células dendríticas a través del CMH tipo II, para su activación, proliferación y diferenciación y de esta manera, activar la respuesta inmune adaptativa y establecer un estado de memoria específica para el antígeno, para que en posteriores encuentros con éste mismo, se realice una eliminación más rápida, vigorosa y efectiva (20). Adicionalmente, los macrófagos y las células dendríticas son las principales células productoras de IL-12, la cual determina el perfil en el cual se van a activar los linfocitos T CD4+, para activar la respuesta inmune adaptativa que se comenzará a gestar en los órganos linfáticos secundarios; igualmente, la IL-12 también induce la producción de IFN $\gamma$  por parte de las células asesinas naturales (NK, natural killer), para dirigir la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia el perfil Th1 (19).

En el caso de trauma o daño tisular en ausencia o no de infección, el proceso de inflamación aguda promueve tanto la reparación del tejido como la prevención de colonización del tejido lesionado por patógenos oportunistas (4). Un impacto traumático también puede inducir la activación de la respuesta inmune innata que puede ser limitada a nivel local en caso de monotrauma o puede resultar en una activación sistémica inmune masiva en caso de politrauma (35).

El tejido lesionado o las células necróticas secretan “alarminas” que luego son detectadas inicialmente por los macrófagos residentes a través de los receptores TLRs que están expresados en su superficie, los cuales inducen la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IFN- $\gamma$ ) como parte de una respuesta de fase aguda. El tejido lesionado también promueve la liberación de histamina por los mastocitos y la producción de bradiquinina y calidina, las cuales actúan directamente sobre el endotelio vascular para facilitar el paso de células inmunes y proteínas séricas hacia el sitio de trauma (36). Los neutrófilos reclutados de la circulación degranulan y liberan varias sustancias activas como citoquinas proinflamatorias (TNF e IL-8), especies reactivas de oxígeno (ROS), proteasas (elastasa y captetina G) óxido nítrico, factor activador de plaquetas, leucotrienos, radicales de oxígeno y mieloperóxido, con el objetivo de llevar a cabo la labor de debridar el tejido lesionado por un lado y por otro activar y reclutar más neutrófilos (34). Finalmente, la respuesta inflamatoria es llevada a cabo y es exitosa cuando los neutrófilos y macrófagos han eliminado los patógenos y tejidos muertos para facilitar la reparación tisular (15); los macrófagos locales y los reclutados de la circulación sanguínea secretan factores de crecimiento para estimular la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágeno y la neo vascularización y de esta manera recuperar la arquitectura habitual del tejido y por ende, su función (1, 3, 6,15). Sin embargo, la falta de regulación del proceso inflamatorio, como pasa con la sobreproducción de citoquinas secundaria a la activación aberrante del sistema de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) innatos con el fin de aniquilar patógenos y células infectadas, puede ser fatal, llegando a ocasionar malfuncionamiento

de los órganos comprometidos, inmunodeficiencia, choque séptico o la inducción de autoinmunidad (3,5).

## 3.3 Homeopatía

### 3.3.1 Definición

La homeopatía etimológicamente deriva de dos raíces griegas: *homeios* = semejante y *pathos* = padecimiento o enfermedad.

La homeopatía, descubierta al final del siglo XVIII gracias a las observaciones y experimentos del Doctor Samuel Hahnemann, se basa en una realidad biológica, la *ley de la similitud*: “Toda sustancia capaz de provocar síntomas patológicos en un individuo sano, es capaz, a dosis infinitesimales, de tratar esos síntomas en un individuo enfermo”. Este conocimiento exacto de la similitud entre el medicamento y la enfermedad, justifica el objetivo específico de la homeopatía, de individualizar al enfermo y su tratamiento, utilizando las capacidades de reacción de cada persona y de este modo, recuperar su equilibrio y ser capaz de mover sus propias defensas en contra de los diferentes agentes patógenos, como virus, bacterias, estrés, contaminación, etc. (12, 13).

Prólogo del Dr. Hahnemann a la sexta edición del Organón de la Medicina, en cuanto a la Homeopatía: “...ella enseña además que sólo puede efectuarse la curación por medio de la reacción de la fuerza vital contra un medicamento apropiado, y que se opera con tanta más seguridad y prontitud, cuanto mayor energía conserva aquella fuerza;...no emplea más que aquellos medicamentos cuyos efectos conoce con exactitud, es decir, la manera de modificar dinámicamente el estado del hombre; busca entre ellos aquel cuya facultad modificadora (la enfermedad medicinal) sea capaz de hacer cesar la enfermedad por su analogía con ella (similia similibus) y da tan solo, a dosis raras y débiles, aquel que sin causar dolor ni debilitar, excite sin embargo una reacción suficiente. Resulta de esto, que extingue la enfermedad natural sin debilitar, atormentar ni inquietar al enfermo, el que recobra las fuerzas a medida que aparece la mejoría...” (14)

Es importante tener claro qué es y qué no es la homeopatía ya que muchos médicos y el público en general tienen una idea errónea de lo que es la homeopatía. Se ha relacionado a la homeopatía con el uso de plantas medicinales (fitoterapia, herbología, etnobotánica, etc.), con el naturismo, con la iridología y hasta con espiritismo y magia, pero todas las anteriores son prácticas muy distintas al modelo homeopático, además la homeopatía no solo utiliza plantas medicinales sino también sustancias de origen mineral y animal para la preparación de los medicamentos. (12, 13)

Adicionalmente, también dentro del ámbito médico se argumenta que la homeopatía no es científica y que obra por simple sugestión: la respuesta ante la primera apreciación es que la homeopatía nació precisamente basada en la observación, la experimentación, la

verificación y la aplicación clínica de fenómenos, procedimientos y leyes; en cuanto a la sugestión, también se han comprobado los efectos de la homeopatía en plantas y animales, en los cuales obviamente la sugestión difícilmente se presenta. (12, 13)

Por tanto, la Homeopatía se puede definir como un sistema médico que se caracteriza por ser natural, científico y holístico y que por tanto, promueve la conservación y recuperación de la salud, aplicando clínicamente el principio de la similitud y utilizando sustancias medicamentosas en dosis infinitesimales (1, 2). (12, 13).

La homeopatía como sistema médico natural:

- Promueve la estimulación de los propios mecanismos de autocuración que todos los seres vivos tenemos y que se han perdido por alguna razón o circunstancia.
- Tiene en cuenta la influencia que tienen los factores ambientales sobre la salud del individuo, emplea sustancias vegetales, animales y minerales como fuente para la elaboración de los medicamentos y uno de sus objetivos es imitar a la naturaleza en la forma de curar.
- Respeta la integridad e individualidad de cada ser humano y aplica el conocido aforismo hipocrático "*primum non nocere*", ante todo no hacer daño.
- Se opone de manera racional a la aplicación y empleo de elementos y procedimientos riesgosos para la salud y más si no son indispensables.
- Tiene en cuenta el régimen de cada paciente y realiza recomendaciones a cada uno según sus características, posibilidades y necesidades.
- Promueve una alimentación saludable y natural de acuerdo a las preferencias y necesidades de cada individuo. (12, 13)

La homeopatía como sistema médico holístico:

- Tiene en cuenta al ser humano como una unidad constituida por un  *cuerpo material*, físico y biológico que responde a las leyes de la materia, de la física y de la biología, por un  *cuerpo mental* que responde a las leyes de la mente, por una  *energía vital* que los une, integra, intercomunica y los mantiene y finalmente por el  *espíritu* que lo conecta con el todo o con lo uno. (12, 13)

La homeopatía como sistema médico científico:

- Está basada desde su nacimiento en un modelo experimental, en el cual, toda sustancia medicamentosa debe pasar por un proceso de investigación específico en individuos sanos para obtener los síntomas que fue capaz de producir en ellos y esos mismos síntomas son los que por la ley de la semejanza es capaz de curar en el enfermo que los manifieste (12, 13).

La homeopatía, basada en los paradigmas “vitalista” y “holístico”, puede ser interpretada a través de los conceptos proporcionados por la teoría de los sistemas dinámicos y de la complejidad. Las tres principales propiedades de los sistemas complejos son la no-linealidad, la capacidad de auto-organización y el dinamismo; el análisis de las implicaciones de estas tres propiedades pueden deslumbrar los vínculos entre la teoría de la complejidad y los principios de la Homeopatía (38).

### 3.3.2 Estructura o cuerpo de la Homeopatía

Toda ciencia se establece sobre principios que estructuren un cuerpo de doctrina formado y ordenado. Los siguientes son los principios sobre los cuales se ha construido el modelo homeopático (12, 37):

- **De semejanza:** se refiere a la capacidad que tiene de curar los síntomas del enfermo, los cuales son semejantes a los producidos por el mismo medicamento en el proceso de experimentación pura.
- **Del vitalismo:** se refiere a las implicaciones y aplicaciones del vitalismo en la concepción de la vida, de la salud, de la enfermedad, de la curación y usos de los medicamentos homeopáticos.
- **De la individualidad:** se refiere a la calidad de los seres vivos y de las cosas que permite distinguirlos de los de su propia especie. Significa que el individuo es indivisible, íntegro, que no se puede dividir sin perder su esencia.
- **De la experimentación pura:** se refiere a la necesidad de experimentar toda sustancia medicinal en individuos sanos antes de administrarla a los enfermos y conocer su potencialidad para curar.
- **De las dosis infinitesimales:** se refiere a la particularidad de los medicamentos homeopáticos de ser diluidos y sucusionados (dinamizados) y lograr, por un lado, atenuar sus efectos tóxicos y por otro, potencializar sus efectos curativos.
- **De acción y reacción:** se refiere al efecto que produce un medicamento cuando se administra a un individuo y describe como ocurre una acción de ese medicamento y una reacción secundaria a la respuesta del mismo individuo.
- **De curación o del orden:** se refiere a la forma normal en la que las enfermedades naturales se curan espontáneamente y resalta que esto es lo que debe hacer la medicina, intentar imitar a la naturaleza en ese orden.
- **De los miasmas:** se basa en que todo ser humano tiene una tendencia innata a enfermar (miasma) y que existen tres formas diferentes de hacerlo: psora, sycosis y syphilis.

### 3.3.3 Dinámica vital ó fisiología

La Homeopatía originalmente se basó en la teoría del Vitalismo, doctrina filosófico-biológica que identifica la existencia de una Fuerza Vital que se encarga de regular los estados y funciones de los organismos y al igual que la Medicina Ayurveda y la Medicina Tradicional China, la Homeopatía resalta el potencial de auto-curación que posee el cuerpo humano y la estrecha conexión mente-cuerpo (37,39). Debido los avances en anatomía, química y física en el siglo XVII, se introdujo la idea mecanicista del funcionalismo orgánico y en reacción a ésta surgió en el siglo XVIII la corriente del Vitalismo, la cual se extendió hasta inicios del siglo XIX, encontrando en Samuel Hahnemann su más claro exponente, quien escribió en el paragrafo 9 del *Órganon: En estado de salud, la Fuerza Vital que dinámicamente anima el cuerpo material, gobierna con poder ilimitado y conserva todas las partes del organismo en admirable y armoniosa operación vital, tanto respecto a las sensaciones como a las funciones, de modo que el espíritu dotado de razón que reside en nosotros, puede emplear libremente estos instrumentos vivos y sanos para los más altos fines de nuestra existencia* (37,40). Es en este paragrafo en el que se fundamenta la Doctrina Homeopática, ya que en ella están basados los conceptos de salud, enfermedad, curación, supresión, patogenesis, acción medicamentosa, entre otros (37).

### 3.3.4 Doctrina médica

Desde el punto de vista del modelo homeopático, el proceso de salud-enfermedad y de curación está basado en la concepción vitalista. El ser humano además de su organismo tiene un dinamismo que lo anima, es decir una fuerza vital, que le confiere inteligencia, sentimientos y voluntad. Esta fuerza vital en estado de salud, gobierna en forma armónica la totalidad del individuo; su desequilibrio generado por la influencia dinámica de un agente hostil, produce los síntomas morbosos de la enfermedad, que estarán determinados de acuerdo a la idiosincrasia de cada individuo, según su forma de sentir y de enfermar (12,37). Con la desaparición de estos síntomas morbosos o patológicos cuando se realiza el tratamiento, se retorna a la salud y por ende, el restablecimiento de la fuerza vital (12, 37,40). Se puede inferir entonces que el proceso de curación consiste en restablecer la salud, en devolverle al individuo su armonía perdida y favorecer el desarrollo de sus facultades para que logre sus metas y la realización de su vida. Por tanto, desde el punto de vista Homeopático, el proceso de salud-enfermedad no es excluyente, sino un opuesto complementario (12).

### 3.3.5 Método diagnóstico

La evaluación homeopática consiste en una evaluación médica general, tomando los elementos de la semiología clásica, pero los complementa y con mucho más detalle (39). La entrevista está estructurada de manera que se puedan obtener los datos necesarios

para generar un cuadro sintomático único del paciente, que coincida con las características de uno de los remedios homeopáticos. Los elementos que se incluyen son: síntomas mentales y emocionales, sensaciones, localización y dirección que toman los síntomas, síntomas concomitantes, modalidades, intensidad, duración y hora de inicio de los síntomas y la secuencia de eventos o circunstancias que el paciente experimentó antes del inicio del síntoma (39). Luego de tomar la lista de síntomas y de realizar la caracterización de cada uno de ellos como también de la personalidad, del estilo de vida y de la reactividad a los eventos físicos y emocionales, el caso del paciente es evaluado en su totalidad. Paso a seguir, se organizan los síntomas de acuerdo al nivel de importancia y de severidad para el paciente (jerarquización) y se realiza la repertorización, que es un proceso mediante el cual se busca entre los medicamentos homeopáticos uno que sea capaz de causar en el experimentador sano una enfermedad artificial lo más parecida o semejante posible a la que queremos curar en nuestro paciente (37)

### 3.3.6 Método terapéutico

El homeópata basado en la repertorización y en sus conocimientos sobre el origen y toxicología de los medicamentos homeopáticos toma la decisión final del remedio a utilizar (39).

Como se ha mencionado, el remedio homeopático tiene la posibilidad de extinguir las enfermedades en la medida que sea capaz de causar síntomas similares a la enfermedad natural (37). Éste se prepara a partir de sustancias que son derivadas de los tres reinos de la naturaleza: vegetal, mineral y animal (2). En la experimentación que hizo Hahnemann en sí mismo y en otras personas sanas, él comprobó la coincidencia que existe entre los efectos tóxicos de los medicamentos dados en grandes dosis por cualquier causa y las observaciones personales cuando se administran en dosis infinitesimales y por eso dedujo que en la toxicidad y nocividad de esas sustancias radica su potencial curativo (37). Sin embargo, el argumento de los escépticos sobre la “inverosimilitud” de la actividad biológica de los medicamentos homeopáticos, por estar diluidos por encima del número de Avogrado y que no permite identificar moléculas por los métodos convencionales, los lleva a ignorar la evidencia positiva que se encuentran en las ciencias básicas, en la pre-clínica y en los estudios clínicos que han demostrado los efectos de los medicamentos homeopáticos tanto *in vivo* como *in vitro* (41). De hecho, los conceptos científicos y las herramientas experimentales actuales (como la espectroscopia Raman y espectroscopia de absorción visual-UV) dentro de las ciencias básicas están ofreciendo nuevos enfoques para la ciencia contemporánea para contribuir al entendimiento del medicamento homeopático. Ejemplo de estos enfoques es la teoría de la memoria del agua, que se basa en la compleja estructura tridimensional del agua en su fase condensada más que en las moléculas del soluto original (41). El agua, principal disolvente de las sustancias o material con la que se preparan los medicamentos homeopáticos, puede formar muchas y diferentes redes complejas entre las moléculas en forma tridimensional, que es lo que se ha denominado

“nanoheterogeneidad” y los fenómenos como la epitaxia (que es la transmisión de la información estructural de la superficie de un material a otro sin la transferencia de materia como tal), los cambios de presión y temperatura durante la succión que lleva a la formación de nanoburbujas coloidales que contienen inclusiones gaseosas de oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno y posiblemente la información del remedio original y efectos de los campos electromagnéticos, juegan un papel importante en la alteración de la estructura del agua (41). Por lo anteriormente expuesto, es que se considera al agua como una molécula central, cada vez más influyente e interconectante, en la mayoría de las reacciones bioquímicas en cuerpo humano, ya que es capaz de captar la información dada, integrarla a su compleja estructura y transmitirla a su sitio correspondiente; de ahí, que el generar cambios en la información del agua corporal, tanto a nivel local como sistémico, podría ser una vía por la cual los remedios homeopáticos inducirían patrones de curación (41).

### **3.4 *Árnica montana***

#### **3.4.1 Origen y descripción**

Su nombre es derivado del griego *estornudar*, ya que en la antigüedad se utilizó esta planta para provocar estornudos. Es conocida como cicatrizante desde el siglo XVI y según leyendas, los escaladores de montaña la masticaban para aliviar los dolores musculares y su nombre de “tabaco de montaña” se debe a que fumaban sus hojas secas para aliviar las enfermedades respiratorias como la bronquitis (25, 26).

*Árnica montana* es una planta herbácea perenne, vivaz, perteneciente a la familia de las Compuestas, que mide entre 15 y 40 cm de altura, con una raíz oscura, un tallo erguido de 25 a 30 cm de largo, estriado, áspero, que tiene pocas ramas y en su base se forma una roseta de hojas lanceoladas que se extienden sobre el suelo. Sus flores son de color amarillo-anaranjado y brotan hacia julio y agosto. Es una planta oriunda de Europa Central y Meridional, Asia Central y América del Norte y suele brotar en los pastos de las montañas donde los suelos son silíceos y ricos en humus (23, 24, 25). Actualmente debido al abuso en su recolección está en peligro de extinción, motivo por el que se encuentra como especie protegida en países europeos como España, Italia y Suiza (27).

Su nombre científico es *Árnica montana* L., y tiene sinónimos como *Caltha alpina*, *Crysanthemum latifolium*, *Doronicum austriacum quartum*, *D. germanicum*, *D. montanum*, *Nardus celtica altera*, *Panacea lapsorum*, *Ptermica montana*. Sus nombres comunes son: árnica de las montañas, tabaco de montaña, tabaco de los Alpes, flor de tabaco, talpica, veneno del leopardo, estornudadera, hierba de las caídas (23, 25).

La composición de la tintura madre es compleja, dado que se prepara a partir de la planta entera, incluyendo la raíz. Dentro de los componentes químicos que se encuentran en sus flores están (23, 24, 25,27):



- Aceites esenciales: terpenos, derivados del timol y del florol y compuestos poliacetilénicos y alcanforados.
- Aceites fijos: como el ácido palmítico, ácido láurico y ácido oleico.
- Alcaloides: arnicina
- Resinas: que son de sabor áspero y contienen citosina y ácido gálico .
- Ácidos orgánicos: ácido fórmico, caféico, angélico y clorogénico, los cuales tienen efectos cardiotónicos, antibióticos y antifúngicos.
- Flavonoides: quercetina y sus derivados quercetol-3-monoglucósido y quercetol-3-glucogalacturónico, astragalina, isoquercitrina, etc., componentes que tienen tanto tropismo venoso como cardiotónico y efectos antifúngicos y antibióticos.
- Principios amargos: como las lactonas sesquiterpénicas helenalina, dihidrohelenalina, chamisonolida, conocidas por producir efectos alérgicos en piel y por su acción antiinflamatoria.
- Alcoholes triterpénicos: arnidiol, faradiol, arnisterina.
- Pigmentos carotenoides: zeaxantina, xantofila, xantofilepósido
- Minerales: manganeso, que junto con los pigmentos carotenoides, generan efectos antineurálgicos, antirreumáticos, antiinflamatorios y antiequimóticos.

En su raíz se encuentran:

- Aceites esenciales: florol-éster, ácido isobutírico
- Ácidos orgánicos: ácido succínico, ácido fumárico, ácido caféico.
- Fructosa, inulina, gomas, sacarosa, cumarinas y taninos catéquicos.

Aunque dependiendo del origen varía su composición, sobre todo de las lactonas sesquiterpénicas; en las plantas de *Árnica montana* que crecen en la región de los Alpes y los Balcanes predomina la helenalina y sus derivados, mientras que en las que se producen en España prevalece la dihidrohelenalina (33).

*Árnica montana* ha sido una de las plantas que tradicionalmente más se ha utilizado en aplicación externa, por su efecto antiinflamatorio, para el manejo de cuadros clínicos dolorosos como el reumatismo, neuralgias, hemorroides y flebitis y de patologías postraumáticas como los esguinces, contusiones, desgarros musculares, esfuerzos musculares excesivos, lumbagos y hematomas; también por sus efectos antisépticos e inmunoestimulantes, se ha usado en el manejo de heridas y úlceras de piel, en afecciones orofaríngeas como amigdalitis, estomatitis, faringitis y heridas bucales(25, 27,28,33) .

En su presentación fitoterapéutica, ya sea en infusión, tintura madre o extracto fluido, se debe limitar a aplicación externa dada su alta toxicidad, causando a nivel cutáneo reacciones de hipersensibilidad y a nivel sistémico irritación severa de mucosas, diarrea, vómito, taquicardia, arritmias y toxicidad hepática y renal (25, 27). Su uso concomitante con antiplaquetarios, agentes trombolíticos, anticoagulantes y heparinas de bajo peso molecular, puede aumentar el riesgo de sangrado (25).

Cuando *Árnica montana* es ingerida ocasiona dilatación vascular, estasis sanguínea e incremento de la permeabilidad capilar. Estos efectos de anti coagulación y de daño de la membrana del endotelio vascular, que hacen que se pasen elementos celulares y proteínas plasmáticas al tejido, explican las hemorragias causadas por esta planta (29).

La utilización por vía interna se hace con las preparaciones homeopáticas (diluidas y dinamizadas), ya que están exentas de toxicidad y se ha convertido en un remedio de urgencia muy efectivo, llegando a popularizarse tanto entre el público como entre los profesionales de la salud (27).

### **3.4.2 Patogenesia homeopática de *Árnica montana* (24, 42,43)**

Hanhemann hizo su experimentación en 1805 y desde entonces para su preparación homeopática se utiliza la planta entera en flor y fresca (23, 24). Para las patogenesias descritas la *Árnica* usada es la americana, que es la que crece en las praderas de Estados Unidos y también en Europa.

#### **3.4.2.1 Acción general**

La experimentación patogenética reúne síntomas a nivel local y a nivel general.

A nivel local:

- Provoca sensaciones de dolor como magulladura o de agujetas en los músculos y en los tejidos blandos, similares a las que aparecen luego de traumatismos o de sobreesfuerzos físicos (24, 28).

- Produce extravasaciones sanguíneas en los capilares, dando un aspecto equimótico (24).

A nivel general:

- Causa un estado febril adinámico, que se manifiesta en el paciente con escalofríos, sed intensa, aliento fétido, rostro enrojecido y congestionado pero con la nariz y el resto de cuerpo frío, que gime al estar dormido y tiene aversión a ser tocado o a que le hablen y se agita en la cama, la cual le parece demasiado dura.

### 3.4.2.2 Síntomas mentales

- Aunque este muy enfermo y grave, afirma sentirse bien, no tiene clara conciencia de su estado y dice que no tiene nada, por lo que rechaza la atención médica.
- Esta triste y taciturno, no quiere que le hablen ni que se le acerquen, quiere estar solo. No quiere entablar conversación y le teme al contacto por sus grandes sufrimientos.
- Nivel de consciencia estuporoso o de inconsciencia durante los episodios de fiebre o en estado postraumático, con frecuencia asociado a incontinencia urinaria y fecal.
- Todo le parece indiferente debido a su estado de fatiga.
- Se le olvida lo que va a decir o lo que ya dijo, de ahí su aversión a la conversación y a contestar y su irritabilidad al interrogarlo.
- Tiene temor de los lugares públicos, piensa que las paredes y edificios le van a caer encima.
- Sueño agitado, se despierta bruscamente, angustiado, se lleva la mano al corazón porque piensa que tiene una enfermedad cardíaca, sin tener nada realmente.
- Deprimido física y mentalmente, triste y fatigado, lo agrava el consuelo y el llanto, hipersensible al ruido y al dolor.

### 3.4.2.3 Síntomas generales

- Es el principal medicamento para el manejo de traumatismos, golpes y contusiones, especialmente de tejidos blandos, acompañados de extravasaciones sanguíneas de color rojo azulado (equimosis). También en efectos o consecuencias de traumatismos inmediatos o de años atrás, generales o locales.
- Útil en torceduras, fracturas, esfuerzos físicos por levantar cosas pesadas.
- Estimula la reabsorción de hematomas y previene condiciones sépticas o de supuración.
- También pueden considerarse como traumatismos los efectos de penas, de remordimientos y de pérdidas económicas súbitas.
- Se mueve de un lado para otro buscando un sitio blando, ya que cualquier cosa sobre la que se acueste le parece dura, incluso la cama.
- Hemorragias en tejidos, piel o por orificios.
- Debilidad marcada que puede llegar hasta la postración, con inicio brusco de los dolores y de los trastornos. Siente todo el cuerpo dolorido como si estuviera lleno de contusiones.
- Deseos de whisky y vinagre
- Aversión a la carne y leche

#### **3.4.2.4 Síntomas particulares**

- Vértigo: al cerrar los ojos, al caminar, al levantarse de estar acostado o agachado, al mover la cabeza.
- Cabeza: consecuencias de golpes o fracturas de cráneo, meningitis postraumática, cuando se sospechen extravasaciones sanguíneas para facilitar y aceleran su reabsorción. La cabeza y/o la cara están calientes con la nariz y el resto de cuerpo fríos cuando se presentan episodios de escalofrío y fiebre. Cefalea como un clavo en las sienes, peor a la derecha y por el movimiento ó cefaleas producidas por pensar, por leer, por caminar, por ascender o por irritabilidad.

- En trauma ocular, con dolor, diplopía, hemorragia retiniana. También en hemorragia conjuntival o palpebral, lagrimeo ardiente, en inflamación por cuerpos extraños. Pupilas insensibles a la luz.
- Sangrado por los oídos, hipoacusia postraumática.
- Sangrado nasal por golpes, por esfuerzos, luego de sonarse, durante el cuqueluchoide, con sangre negra y fluida.
- Cara roja, caliente, hundida, con manos frías. Herpes y parálisis facial sobre todo derecha, úlceras en las comisuras labiales. Inflamación y dolor en glándulas submaxilares y en ganglios del cuello.
- Olor pútrido del aliento y de los flatos, como huevos podridos. Lengua con saburra blanca o con centro color marrón. Dolor dental pos trauma o post-operatorio. Sensación de algo duro en garganta.
- Sed en los episodios de escalofrío, hematemesis con sangre coagulada oscura, gastralgias cuando come.
- Dolor pélvico que lo hace caminar doblado. Dolor hepático que se agrava al acostarse sobre el lado izquierdo. Gases que oprimen hacia arriba y hacia abajo. Incontinencia fecal, sobre todo durmiendo, acompañado también de incontinencia urinaria. Diarrea en la tuberculosis, disentería. Constipación, con recto lleno y las heces no salen. Hemorroides que alternan con prolapso rectal.
- Micción dolorosa con chorro débil y difícil. Incontinencia urinaria después del parto. Enuresis. Cólico renal intenso en dorso y caderas como si pasara un cálculo. Hematuria postraumática.
- Pene y testículos hinchados y equimóticos postraumáticos. Orquitis por contusión.
- Menstruación abundante, adelantada, rojo-brillante, con coágulos, acompañado de cabeza caliente y extremidades frías. Metrorragia post-coito o intermenstrual. Movimientos del feto le generan dolor a la madre, que la despierta en las noches. Entuertos intensos que se agravan con la succión del bebé. Varices dolorosas vulvovaginales. Previene las hemorragias y dolor perineal postparto.
- Herpes labial que se acompaña de tos violenta. Tos por ira, por bostezar, por gritar, por llorar en exceso. En el cuqueluchoide el niño llora antes y después del acceso de

tos. Expectoración hemoptoica por golpes o por sobreesfuerzos musculares. Disfonía o ronquera por hablar mucho.

- Tórax muy dolorido al toser que debe agarrárselo con las dos manos. Dolor en la caja torácica, peor al moverse, al toser o respirar. Neumotórax. Edema cardiogénico con disnea molesta. Mastitis postraumática.
- Dolor en extremidades como dislocado o golpeado con gran miedo a que lo toquen. Tendones y articulaciones débiles posteriores a un esguince o golpe. Ulceras varicosas. Tétano.
- Sueños repetitivos: de muerte, de cuerpos mutilados. Insomnio e inquietud cuando está muy cansado.
- Paludismo manifestado con gran congestión cefálica, cuerpo frío, sed, escalofrío y con sensación de magulladura en el cuerpo.
- Fiebre traumática., aunque dice que no le pasa nada. Septicemia, previene la supuración.
- Manchas azuláceas dolorosas. Equimosis espontaneas o por el mínimo contacto. Acné simétrico. Eritema nudoso. Posterior a picaduras de abejas o avispa o por lesión por astillas o espinas.

#### **3.4.2.5 Sensaciones**

- De magulladura local
- De agujetas
- Impresión de que la cama está muy dura

#### **3.4.2.6 Modalidades**

- Empeoramiento: al menor contacto, con las sacudidas y el movimiento de las partes afectadas, con el frío húmedo, acostado del lado izquierdo, por el vino.
- Mejoría: con el reposo, acostado con la cabeza baja, desea aire libre.

### 3.4.2.7 Indicaciones clínicas

- Traumatismos: consecuencias de caídas, choques, accidentes, heridas. Cuidados pre y post-operatorios, en el postparto, cefalohematomas de los recién nacidos.
- Fatiga muscular: después de esfuerzos físicos pesados, en la afonía de los oradores o cantantes, insomnio posterior a fatiga física, en el embarazo.
- Daños venosos o capilares: púrpura espontánea, hemorragia conjuntival, equimosis o hematomas con el menor contacto, nefritis con hematuria, hemorroides agudas; cualquier episodio de hemorragia aguda, protección arterial en los hipertensos.
- Síndrome febril adinámico: acompañado de síntomas hemorrágicos o de síntomas digestivos como halitosis, náuseas, gastralgias, diarrea fétida, meteorismo. Estos síntomas digestivos se pueden presentar también luego de esfuerzos físicos prolongados o intensos.

### 3.4.3 Estudios *in vivo* y *in vitro*

De los estudios sobre actividad antiinflamatoria de *Árnica montana* realizados *in vitro* todos son realizados con los extractos fitoquímicos, especialmente con las lactonas sesquiterpénicas helenalina y dihidrohelenalina.

- Berges y su equipo, en Alemania en el año 2009, llevan a cabo un estudio *in vitro* con sangre periférica de donantes sanos, para evaluar la actividad inmunomoduladora de la helenalina extraída de *Árnica montana* sobre células T CD4 activadas y demuestran que la helenalina, por un lado, disminuye la expresión de receptores de superficie asociados a la activación de la célula T, tales como el CD25 (receptor de la IL-2), CD28, CD27 y CD120 (receptor del TNF), los cuales son requeridos para una adecuada señalización vía NF- $\kappa$ B y esto conlleva a suprimir la proliferación de las células T CD4 activadas y reestimuladas y, por otro, suprime la translocación nuclear del NFAT, el cual es un factor de transcripción que media la activación de genes que codifican para CD25, IL-2 e INF- $\gamma$ , que son esenciales para la función de las células Th1 (32).
- Klass *et al*, también en Alemania, en el año 2001, realizan un estudio sobre la influencia de dos tipos de *Árnica montana*, una de origen español y otra tipo "Arbo", en la producción de citoquinas IL-1 y TNF en células mononucleares de sangre humana, las cuales fueron preincubadas con las dos tinturas madre y posteriormente estimuladas con lipopolisacárido de *Escherichia coli*, y encuentran que la tipo "Arbo" es más efectiva en la inhibición de la producción de estas

citoquinas proinflamatorias. También hacen un ensayo sobre la inhibición de estas tinturas sobre la producción de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y el NF-AT, demostrando mayor efectividad sobre el segundo y finalmente afirman que las lactonas sesquiterpénicas actúan directamente sobre la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B, como se ha visto en otros estudios (7).

Estudios clínicos en inflamación utilizando *Árnica montana* homeopatizada:

- Macedo, Ferreira, Perazzo y Tavares realizan en Brasil en el 2003 un estudio clínico en ratas con el objetivo de valorar la actividad antiinflamatoria de *Árnica montana* 6CH usando modelos de inflamación aguda y crónica en animales, mostrando que la eficacia de esta preparación homeopática es eficaz en el proceso inflamatorio pero siendo necesario un régimen pretratamiento (29).

Se encontraron dos estudios *in vitro* con **lactonas sesquiterpénicas** pero derivadas de otras plantas:

- Guido y su equipo en Alemania hacia 1998 realizan un estudio *in vitro* sobre la actividad antiinflamatoria de la lactona sesquiterpénica helenalina derivada de *Árnica chamissonis* spp *foliosa*, con células T expuestas a ésta, demostrando que la helenalina interfiere con la unión de NF- $\kappa$ B al DNA a través de la alquilación de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B (30).
- Egon Koch y su equipo en Brasil en el año 2001, llevan a cabo un ensayo en macrófagos peritoneales de ratón, exponiéndolos a las lactonas sesquiterpénicas (derivadas de *Milleria quinqueflora*, *Mikania guaco*, entre otras) y mostraron como éstos componentes fitoquímicos inhiben la liberación de IL-1, IL-6 y TNF por parte de los macrófagos (31).



## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1 Preparación de formulaciones homeopáticas de *Árnica montana***

La *Árnica montana* se prepara de acuerdo a la farmacopea homeopática de los Estados Unidos Mexicanos (23), la regla de preparación es la número 3 para la escala centesimal: Un volumen (gotas) de tintura madre (la cual se obtiene de 100 gr de materia vegetal fresca y triturada más 100 cc de agua destilada y 635 cc de alcohol para obtener 1000 cc de tintura), tres volúmenes de agua destilada y seis volúmenes de alcohol constituyen la dinamización 2CH (Centesimal Hahnemanniana). 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 deseadas.

Se adquirió *Árnica montana* de una fuente comercial y las diluciones utilizadas en el experimento fueron 6CH, 15CH, 30CH, 60CH, 200CH y 1000CH.

### **4.2 Aislamiento de células mononucleares en sangre periférica (PBMC)**

Las muestras de sangre periférica heparinizada se tomaron de 10 voluntarios sanos, a quienes se les realizó la historia clínica completa, con el objetivo de excluir aquellos sujetos que hayan presentado alguna patología infecciosa en el último mes, previo a la toma de muestra, como también aquellos pacientes que manifiesten algún antecedente de enfermedades crónicas inflamatorias o que estén recibiendo algún tratamiento farmacológico alopático u homeopático. Los donantes de la muestra que estuvieron de acuerdo con el procedimiento, previamente firmaron el consentimiento informado. (Anexo No. 1).

Las células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos se obtuvieron mediante gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque por centrifugación a 400g por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI Invitrogen® a 300g por 10 min y la densidad celular se calculó por conteo en cámara de Neubauer.

### 4.3 Cultivo celular

Las células mononucleares fueron mantenidas a 37°C, en atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL-life Technologies Inc, Grand Island, NY), suplementado con 10% de suero del mismo paciente, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina estreptomina.

### 4.4 Evaluación de la viabilidad celular con MTT

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

Este procedimiento de evaluación de la toxicidad se realizó en cajas de cultivo de 96 pozos, en los cuales se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo contenidas en un volumen total de 150µl. Las células se sembraron por triplicado, para cada dilución de compuesto y se utilizaron 6 pozos control sin adición del compuesto. El tratamiento con el compuesto se realizó adicionando 2, 4, 6, 8, 10 y 12µl de las diluciones 6, 15, 30, 60, 200 y 1000CH de *Árnica montana* por triplicado. El efecto de la *Árnica montana* se evaluó a las 48 y 72 horas por el método colorimétrico de MTT. Para esto, una vez cumplido el tiempo del tratamiento, el medio de cultivo fue retirado de cada pozo y se adicionó 100µl de la solución de MTT preparada en medio de cultivo RPMI sin suero y fueron incubadas por 4 horas a 37°C. Cumplido este tiempo de incubación se retiró el MTT de los pozos, y los cristales de formazán formados por la células vivas fueron disueltos adicionando a los pozos de cultivo 100µl de dimetilsulfóxido DMSO e incubados en oscuridad por 15 minutos. Se obtuvieron lecturas de absorbancia a 595nm en un lector de placas Humareader utilizando como blanco 3 pozos con el disolvente DMSO.

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

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

La curva dosis respuesta se calculó teniendo en cuenta el rango de diluciones utilizadas y el porcentaje de reducción o aumento del crecimiento celular correspondiente. A partir de ello se calculó la dilución que produjo la reducción de la viabilidad celular en un 50 %.

## 4.5 Cuantificación de citoquinas proinflamatorias – IL-1

Para evaluar el efecto de *Árnica montana* sobre la modulación de IL-1 se aislaron las células mononucleares de sangre periférica de 10 individuos sanos; las cuales fueron expuestas a las diluciones descritas del compuesto homeopático, en una relación 4:150µL durante 48 horas. Cumplido este tiempo, se recogieron los sobrenadantes del cultivo, los cuales se centrifugaron a 3000rpm por un minuto. La concentración de IL-1 se midió para cada paciente utilizando el kit de Elisa IL-1β humana (Abcam, ab46030), siguiendo las especificaciones del protocolo del fabricante.

## 4.6 Analisis estadístico

Con el fin de evaluar las diferencias entre las diluciones de *Árnica montana* utilizadas sobre la población celular, se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo (La Jolla, CA, USA) para llevar a cabo un análisis pareado no paramétrico, tanto para los ensayos de viabilidad como para los de Elisa.

## **5. Resultados**

### **5.1 Viabilidad celular ante la exposición a diferentes diluciones de *Árnica montana***

Dado que la determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa, este procedimiento se realizó con la adición de diferentes volúmenes y diluciones de *Árnica montana* homeopatizada a los cultivos de células mononucleares, encontrando que este medicamento homeopático en sus diferentes diluciones tiende a generar aumento del crecimiento celular, incluso cerca del 160% con la dilución 1000CH ( $p < 0.005$ ) y solo se observó disminución de la viabilidad celular en menos del 20% con la dilución 6CH ( $p < 0.0001$ ).

### **5.2 Cuantificación de il-1 frente a la exposición a *árnica montana* en diferentes diluciones**

En el ensayo de producción de IL-1 no se obtuvo un patrón de respuesta sino que ésta es diferente en cada muestra, sin embargo, se observa una alternancia entre inactividad, inhibición y estimulación en cada una de ellas, llamando la atención que las diluciones más altas, como son la 60, 200 y 1000CH, tienden a estimular la producción de IL-1 en varias muestras de los donantes.

## 6. Discusión

De acuerdo con el objetivo del trabajo, con el cual se quiere investigar a cerca de la actividad inmunomoduladora del medicamento homeopático *Árnica montana*, se realizó primero el ensayo de toxicidad y posteriormente la medición de la producción de IL-1 por poblaciones celulares de linfocitos T cultivados *in vitro* expuestas a este medicamento homeopático.

Con los resultados obtenidos sobre la toxicidad de las seis dinamizaciones de *Árnica montana* se muestra como este medicamento homeopático produce una respuesta mitogénica, incluso cerca del 160% con la dilución 1000CH ( $p < 0.005$ ) y solo se observó disminución de la viabilidad celular en menos del 20% con la dilución 6CH ( $p < 0.0001$ ). Esto nos lleva, por un lado, a confirmar la ausencia de toxicidad del medicamento homeopático, y por otro, a deducir que *Árnica montana* homeopatizada estimula el proceso de mitosis, siendo éste uno de los posibles mecanismos a través de los cuales induce la reparación del daño tisular ocasionado por un traumatismo.

En el ensayo de producción de IL-1 no se obtuvo un patrón de respuesta sino que ésta es diferente en cada muestra, observándose a primera vista que no hay una relación directa o lineal entre la potencia y la modulación de IL-1, sino una alternancia entre inactividad, inhibición y estimulación en cada una de ellas, lo que concuerda con lo observado por algunos autores, como Benveniste y Poitevin en Francia (49), en los experimentos en los que usando diferentes dinamizaciones se presenta una relación dosis efecto inusual y compleja, que alterna entre inhibición, inactividad y estimulación, generando una curva pseudosinusoidal.

Está descrito en Homeopatía, que las diluciones bajas y medias (desde la tintura madre hasta la 15CH en la escala centesimal) tienen una acción más orgánica y tisular y las diluciones altas y muy altas (por encima de la 30CH) tienen una acción más profunda, es decir a nivel de la energía vital o eje psico-neuro-endocrino-inmunológico. En los resultados de nuestro experimento con *Árnica montana* homeopatizada se observa cómo las diluciones bajas y medias (6 y 15CH) en varias de las muestras, generan una modulación negativa en la expresión de la IL-1, es decir, que controla la respuesta inflamatoria a nivel local, llevando a la reparación a ese nivel y de esta manera evitando que se extienda a nivel sistémico. En cuanto a las diluciones más altas, como son la 30, 60, 200 y 1000CH, tienden a estimular la producción de IL-1, lo que nos lleva a deducir que, como estas potencias tienen una acción a un nivel más profundo o del "terreno" del

paciente, es este nivel o eje el que está reaccionando y dando la orden o estímulo para que haya, por un lado, reorganización celular y tisular en los sitios lesionados y dolorosos y por otro, que en su forma de reaccionar ante el traumatismo o lesión, no se genere interferencia en el bienestar de ese individuo, es decir, sin secuelas físicas ni emocionales.

En este modelo experimental, por lo tanto, se ilustran varios de los principios de la Homeopatía, entre ellos, el de la Similitud, el de la individualidad y el de las dosis infinitesimales.

El principio de la Similitud, que refleja la inversión de los efectos farmacológicos en sujetos sanos, en comparación con los enfermos, lo podemos observar con *Árnica montana*, la cual, como se mencionó anteriormente, es una planta que usada en infusión o como extracto tópico u oral, desencadena procesos de inflamación a nivel cutáneo, de mucosas y con alta toxicidad hepática y renal, además de dilatación vascular, estasis sanguínea e incremento de la permeabilidad capilar que se manifiesta con hemorragias y equimosis. Con los resultados de nuestro modelo experimental se puede observar, aunque de manera individual, como *Árnica montana* homeopatizada modula la producción de IL-1, principal citoquina responsable de la respuesta inflamatoria aguda y que clínicamente se usa en los pacientes que presentan estos síntomas característicos ocasionados por trauma o enfermedades clínicas.

El principio de las dosis infinitesimales se refiere a una de las características más destacadas y conocidas de los medicamentos homeopáticos como es la baja concentración de las sustancias que contienen y esto hace que la Homeopatía sea controversial, dado que los medicamentos en altas potencias contienen factores de gran dilución que están en un orden de mayor magnitud que el número de Avogadro, por lo que en teoría no debería haber restos medibles de los materiales originales ni ser portador de propiedades (44, 46). Ya se conoce que en las diluciones superiores a la 12CH se ha sobrepasado este número de Avogadro (46).

Actualmente, los conceptos científicos y las herramientas experimentales disponibles dentro de las ciencias básicas (como la espectroscopia Raman y espectroscopia de absorción visual-UV) están ofreciendo nuevos enfoques para la ciencia contemporánea para contribuir al entendimiento del medicamento homeopático. Ejemplo de estos enfoques es la teoría de la memoria del agua, que se basa en la compleja estructura tridimensional del agua en su fase condensada más que en las moléculas del soluto original (41). El agua puede formar muchas y diferentes redes complejas entre las moléculas en forma tridimensional, que es lo que se ha denominado "nanoheterogeneidad" y los fenómenos como la epitaxia (que es la transmisión de la información estructural de la superficie de un material a otro sin la transferencia de materia como tal), los cambios de presión y temperatura durante la succión que lleva a la formación de nanoburbujas coloidales que contienen inclusiones gaseosas de oxígeno,

dióxido de carbono, nitrógeno y posiblemente la información del remedio original y efectos de los campos electromagnéticos, juegan un papel importante en la alteración de la estructura del agua (41). Por lo anteriormente expuesto, es que se considera al agua como una molécula central, cada vez más influyente e interconectante, en la mayoría de las reacciones bioquímicas en cuerpo humano, ya que es capaz de captar la información dada, integrarla a su compleja estructura y transmitirla a su sitio correspondiente; de ahí, que el generar cambios en la información del agua corporal, tanto a nivel local como sistémico, podría ser una vía por la cual los remedios homeopáticos inducirían patrones de curación (41).

Otro estudio realizado por Chikramane y su grupo en el Departamento de Ingeniería Química del Instituto de Tecnología de India, con Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y con difracción de electrones y análisis químico por espectroscopia de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) demostró por primera vez la presencia de entidades físicas en diluciones extremas, en forma de nanopartículas de los metales de partida y sus agregados (44). Durante este experimento percibieron que durante el proceso de succusión, el golpeteo de las soluciones genera numerosas nanoburbujas, como resultado de la compresión del aire y de cavitación, debido a la generación de ondas de ultrasonido; las partículas del material de partida se unen inmediatamente a la superficie de estas nanoburbujas y de la cavitación formando complejos que luego suben a la superficie de la solución. La capa superior se recoge y se añade a la siguiente dilución con 99 partes del disolvente y el proceso de succusión se realiza de nuevo. Este proceso es el que hace que el material de partida continúe pasando de una solución a la siguiente, resultando en una asíntota más allá de la 6CH (44).

De igual manera, en Nápoles, Italia, el experimento de termodinámica realizado por Vittorio Elia y Marcella Niccoli en el Departamento de Fisicoquímica de la Universidad Federico II de Nápoles, sobre el efecto de las diluciones agitadas sobre las propiedades fisicoquímicas del agua usada como solvente, mostró que en el 92% de las muestras diluidas y agitadas, incluso llegando hasta la 30CH, la liberación de energía exotérmica fue mayor con respecto al control, manteniéndose por varias semanas este excedente de calor. En este estudio de investigación también se evidenció que en las diluciones homeopáticas se detectó una mayor conductividad eléctrica y un pH más alto que en el control (47, 48).

En cuanto al principio de la individualidad, el cual es uno de los pilares de la Homeopatía y una ley universal aplicable a todo lo que existe, tiene grandes repercusiones desde el punto de vista doctrinario, clínico y semiológico. La individualidad, que se define como el conjunto de características propias de cada individuo y que lo hace distinto del resto de integrantes de la misma especie y del universo entero (12, 14), se ve muy bien reflejada en los resultados de nuestro experimento con *Árnica montana* en cuanto a la modulación de la respuesta inflamatoria, ya que de acuerdo a la predisposición a enfermar o también llamado “terreno” o “miasma” y a las influencias del medio ambiente, es que cada uno

responderá de diferente forma frente a la acción de un mismo medicamento, de la misma manera que los seres humanos respondemos distinto frente a los diversos estímulos externos (físicos, químicos, climáticos, emocionales, etc).

Todo ser humano tiene una predisposición o tendencia innata a enfermar de cierta forma y esto es lo que en Homeopatía se ha denominado Miasma. Es decir, cada individuo tiene su predisposición a padecer ciertas enfermedades y no otras, tiene ciertas formas de expresar su susceptibilidad genética, su forma de sentir, su forma de reaccionar. Y es sobre este terreno donde influye el medio ambiente, entendiendo este último como el conjunto de elementos y circunstancias que rodean a un individuo, tales como el régimen alimenticio, su entorno familiar, social, cultural, espiritual, político y económico, las condiciones climáticas y geográficas donde vive, medicamentos y químicos, etc. (12, 51), pero quien media la influencia del medio ambiente sobre el genoma humano y su susceptibilidad a la enfermedad son los mecanismos epigenéticos, los cuales se encargan de modular o gobernar la expresión de los genes sin afectar la secuencia del ADN, son como patrones de expresión genética que no son determinados por la cadena de pares de bases del ADN de cada individuo, sino que son dependiendo de ciertas condiciones bioquímicas, como son la metilación del ADN ó la metilación, fosforilación y acetilación de las histonas, como también la forma de la cromatina (51, 52).

Por lo tanto, debemos considerar como elemento clave la influencia de la epigenética en la patogénesis de las enfermedades multifactoriales, en especial las que tienen que ver con la respuesta inflamatoria.

Otro tipo de característica genética importante a tener en cuenta es la variación en la secuencia del ADN del genoma humano, la cual puede influir en la susceptibilidad, progresión, severidad de la enfermedad al interactuar con factores de riesgo reconocidos (51). Entre las variaciones en el genoma humano se encuentran las de polimorfismo de un solo nucleótido o SPN (*Single Nucleotide Polymorphism*) que afectan a una sola base de una secuencia del genoma (adenina, timina, citosina, guanina). Por lo tanto, estas variaciones en la secuencia del ADN también pueden influir en la respuesta de cada individuo a los patógenos, a los fármacos y productos químicos, etc. (51)

La IL-1, citoquina que juega un rol central en la mediación de la respuesta inflamatoria aguda, ha sido usada para ilustrar cómo la variación en la secuencia del ADN de genes que codifican para los miembros de esta familia de la IL-1, tiene efectos relevantes sobre la respuesta inflamatoria e inmune, al interactuar con los factores ambientales y las modificaciones epigenéticas, determinando así los fenotipos de las enfermedades multifactoriales como también el fenotipo de salud (51).

Estudios realizados sobre la variación genética en la región promotora del gen de la IL-1, identificaron hasta cuatro SPN, que influyen en su actividad y han mostrado la vinculación entre el polimorfismo genético que hay dentro de la IL-1 con la región del gen



---

de la artritis reumatoidea erosiva y de la espondilitis anquilosante (51). De igual manera, han mostrado como la regulación epigenética influye en el programa genético de desarrollo y activación del factor nuclear kappa B (NF-κB).

Por lo tanto, varios factores contribuyen a los resultados, a saber:

- La no linealidad en la relación dosis-respuesta a las diferentes potencias del medicamento homeopático, que depende de la individualidad y la influencia de la epigenética.
- El estado fisiopatológico del organismo tratado o el llamado terreno o miasma.
- Farmacodinamia del medicamento homeopático, el cual cuenta también con una individualidad, es decir, con unos efectos únicos, que se conocen en la realización de la experimentación pura.

Aunque con un modelo experimental *in vitro* no es posible evaluar en su totalidad el efecto inmunoregulador del medicamento homeopático sobre el eje psico-neuro-endocrino-inmunológico y sobre el estado fisiopatológico de cada individuo, se deja abierta la posibilidad de realizar estudios clínicos que ayuden a corroborar lo que por años se ha visto y escrito en los libros de Materia Médica Homeopática y lo que desde hace varios siglos han querido transmitirnos figuras ilustres como Hipócrates y Samuel Hahnemann.



## 7. Conclusiones y recomendaciones

Mediante la realización de este trabajo experimental *in vitro* se demuestra la respuesta individual en cada muestra, lo que denota los principios de la individualidad y los efectos también de los mecanismos epigenéticos que hay sobre cada donante. Por lo tanto, se puede afirmar que no hay una relación directa o lineal entre la potencia y la modulación de IL-1 por parte de *Árnica montana* homeopatizada, pero si se observa una relación alterna entre inactividad, inhibición y estimulación de la producción de IL-1, que ha sido descrita por experimentadores en otros países.

Es interesante ver que así como cada ser humano tiene su código genético y epigenético, también tiene su propio código o mapa homeopático, donde cada sujeto tiene su propia respuesta a las diferentes potencias homeopáticas usadas, pero lastimosamente por costos esto no lo podemos realizar en nuestra consulta diaria, pero basados en una historia clínica completa, conociendo todos los antecedentes familiares, patológicos y caracteriológicos de un individuo, se podrá intuir el miasma o predisposición a enfermar de ese individuo, para así poder actuar de manera eficaz, con el remedio homeopático y la potencia adecuados.



## A. Anexo: Consentimiento informado

Fecha dd \_\_\_\_ mm \_\_\_\_ aa \_\_\_\_

**Fase II: Efecto de *Árnica montana* L. homeopatizada, en la regulación de citoquinas Proinflamatorias y Antiinflamatorias en cultivos celulares de células mononucleares humanas de sangre periférica.**

**El fin de este trabajo de investigación que se está desarrollando en la Universidad Nacional de Colombia es con el propósito de determinar la acción del *Árnica montana* en un cultivo de células mononucleares de sangre periférica.**

Para realizar la medición es necesario obtener una muestra de sangre venosa periférica de donantes voluntarios. La muestra será tomada con todas las condiciones de bioseguridad, a partir de dicha muestra se obtendrán poblaciones de células mononucleares periféricas, las cuales serán expuestas al medicamento homeopático *Arnica montana* y luego se analizará por ELISA. Una vez se realicen y registren las observaciones no se utilizarán con ningún otro propósito. Estas células mononucleares 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: 1. dolor mínimo mientras se realiza la punción y algunos minutos después. 2. Puede aparecer un moretón en el sitio de punción, que desaparecerá en pocos días sin necesidad de tratamiento. 3. 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 realizarán más punciones de las que usted autorice.

Con su firma hace constar que entiende lo anteriormente expuesto y acepta participar libre y voluntariamente en el estudio.

Nombre \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

CC \_\_\_\_\_

Tel \_\_\_\_\_

## FIGURAS

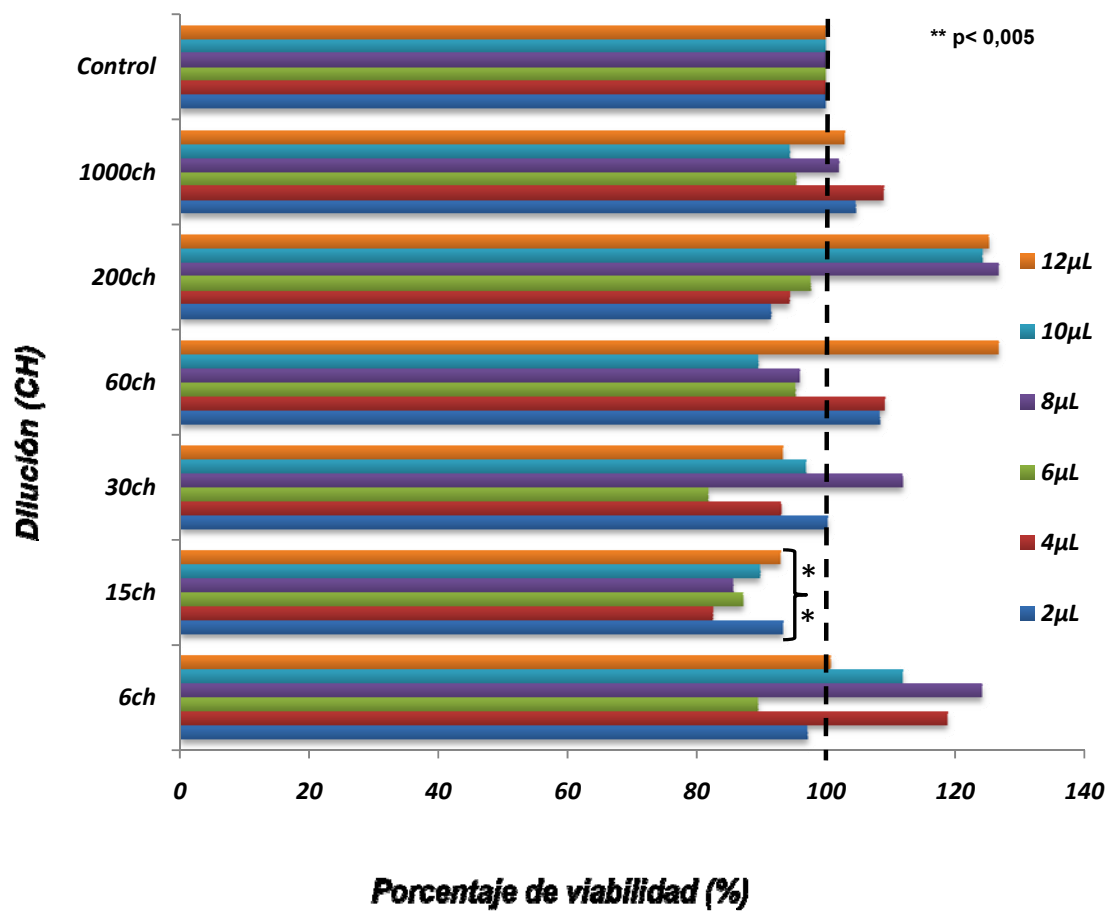
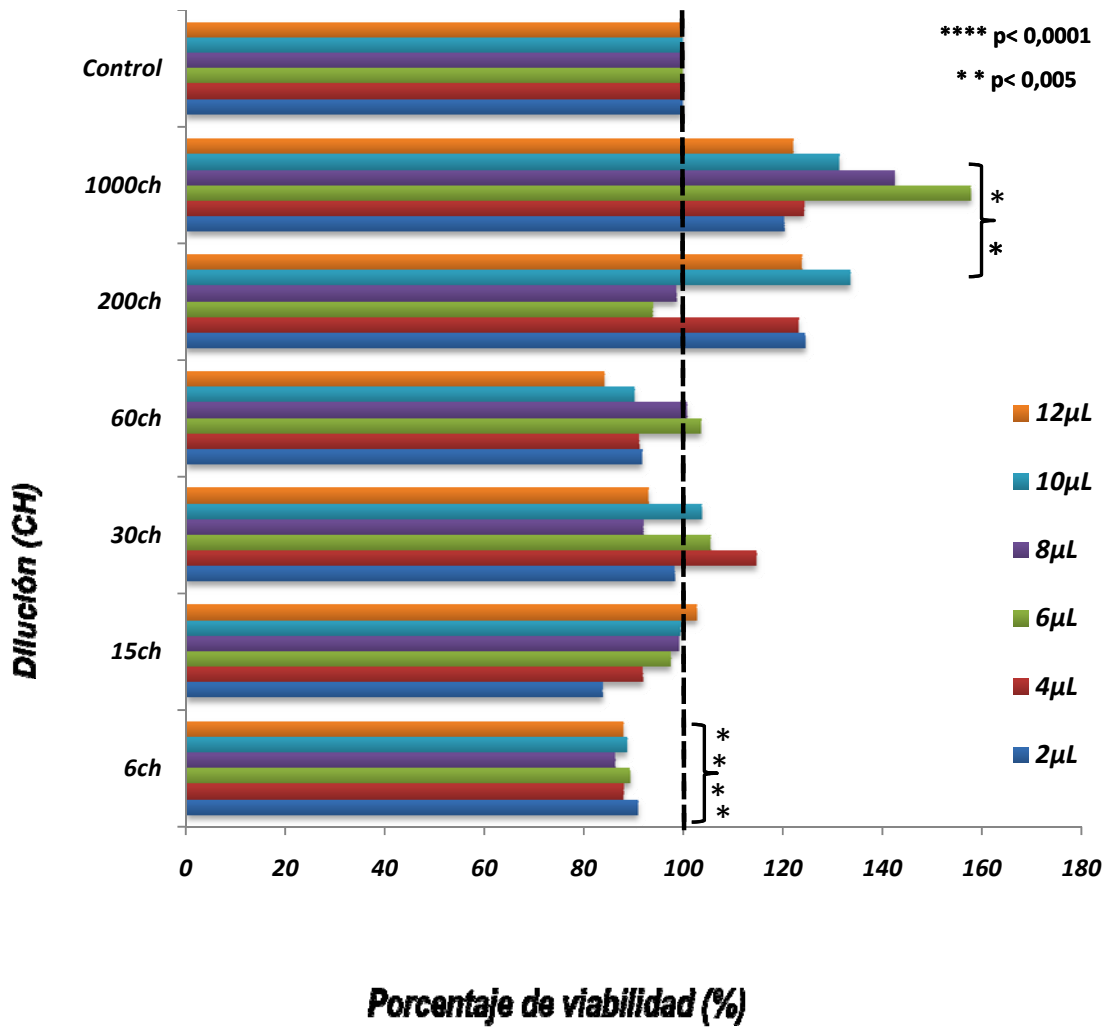
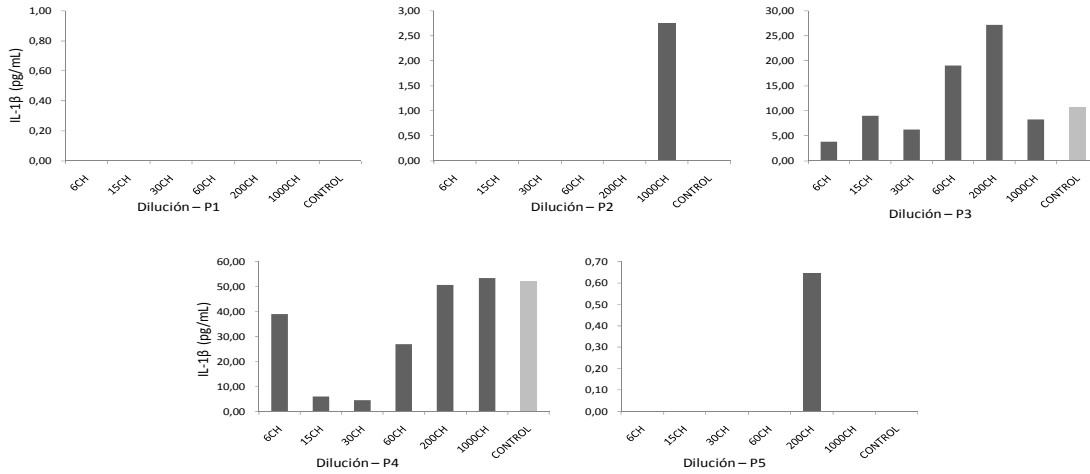
FIGURA 1. Viabilidad celular con MTT-*Árnica montana* a las 48 horas

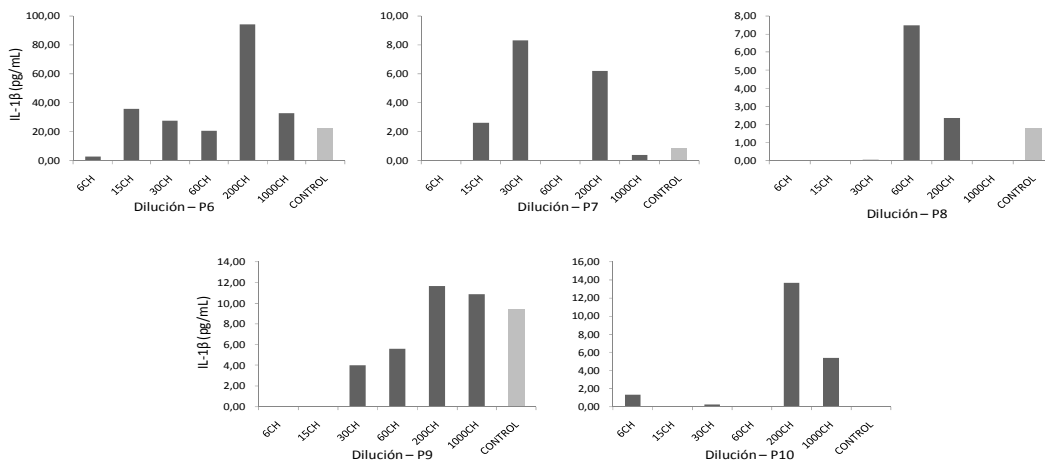
FIGURA 2. Viabilidad celular con MTT-*Árnica montana* a las 72 horas



**FIGURA 3. Efecto *in vitro* de *Arnica montana* homeopatizada sobre los niveles de IL-1 $\beta$  en células mononucleares de sangre periférica**



**Efecto *in vitro* de *Arnica montana* homeopatizada sobre los niveles de IL-1 $\beta$  en células mononucleares de sangre periférica**





## Bibliografía

1. Abbas A., Lichtman A., Pober J. Inmunología celular y molecular. Cuarta edición. Madrid, España: Editorial McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U., 2004.
2. Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kuby J. Immunologic. Quinta edición. México D.F: Editorial McGraw-Hill-Interamericana editores, S.A de C.V. 2004.
3. Takeuchi O., Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell. 2010 Mar 19;140(6):805-20. Review.
4. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Cell. 2010 Mar 19;140(6):771-6.
5. Rugeles M., Patiño P., Montoya C. Inmunología: una ciencia activa. 2ª edición. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia, 2009. 91-124.
6. Margni R. Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana S.A., 1996.
7. Klaas CA, Wagner G, Laufer S, Sosa S, Della Loggia R, Bomme U, Pahl HL, Merfort I. Studies on the Anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals Prepared from *Arnica* Flowers. Planta Med. 2002 May;68(5):385-391.
8. Lyss G., Schmidt TJ., Merfort I., Pahl HL. Helenalin, an Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactone from *Arnica*, Selectively Inhibits Transcription Factor NF- $\kappa$ B. Biol Chem. 1997 Sep;378(9):935.
9. Lyss G, Schmidt TJ, Merfort I, Pahl HL. The Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactone Helenalin Inhibits the Transcription Factor NF- $\kappa$ B by Directly Targeting p65. Biol Chem. 1998 Dec; 273(50):33508-33516.
10. Echeverry N, Mockus I. Factor Nuclear kb (nf-kb): Signalosoma y su Importancia en Enfermedades Inflamatorias y Cáncer. Universidad Nacional de Colombia. Rev.Fac.Med 2008 Vol. 56 No. 2
11. Rüngeler P, Castro V, Mora G, Gören N, Vichnewski W, Pahl HL, Merfort I, Schmidt TJ. Inhibition of Transcription Factor NF- $\kappa$ B by Sesquiterpene Lactones: a Proposed Molecular Mechanism of Action. Bioorg Med Chem. 1999 Nov;7(11):2343-52.
12. Barrios J. *et al.* Doctrina Homeopática. Fundación Instituto Colombiano de Homeopatía Luis G. Pérez, 2005: 12-21.
13. Hahnemann S. Tratado de las Enfermedades Crónicas y su tratamiento homeopático. Traducción hecha por P. Smichdt y J. Kunzli. Maisonneuve, 3ra edición, 1969.
14. Hahnemann S. Órganon de la Medicina. Editorial Albatroz Saci, Buenos Aires, República Argentina, 1991.
15. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Insight Review. Nature, Vol 454, 24 July 2008.
16. Lee JI and Burckart GJ. Nuclear Factor Kappa B: Important Transcription Factor and Therapeutic Target. J Clin Pharmacol .1998 Nov; 38(11):981-993. Review.

17. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 30;72(11):1493-505. Epub 2006 Apr 27.
18. Barnes PJ. Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (1997) 29, 867-870.
19. Fainboim L, Geffner J. Introducción a la Inmunología Humana. 5ª edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A. 2005.
20. Regueiro J, Lopez C. Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A. 1996.
21. Sundrud MS, Nolan MA. Synergistic and combinatorial control of T cell activation and differentiation by transcription factors. *Curr Opin Immunol.* 2010 Jun;22(3):286-92.
23. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos .Comisión Permanente de los Estados Unidos Mexicanos D.R.© Primera edición. Instituto Politécnico Nacional Altres Costa-amic Mexico 1998. Pág. 110
24. Demarque D, Jouanny J, Poitevin B, Saint-Jean Y. Farmacología y material médica homeopática. 1ª. Edición. CEDH Edición Francesa, 1997.
25. Arango M. Plantas medicinales. Botánica de interés medico. Pág. 68-71. [Consultado el día 14 de octubre de 2010]. Disponible en la página web: [http://books.google.com.co/books?id=fefaqvwwHhOYC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q=arnica&f=false](http://books.google.com.co/books?id=fefaqvwwHhOYC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=arnica&f=false).
26. Martínez V. *Árnica*. Asociación Cordobesa de Farmacéuticos Homeopáticos, 1998. [Consultado el día 14 de octubre de 2010]. Disponible en la página web: <http://www.acfah.org/med/vegetales/arnica.php>
27. Ara A. 100 plantas medicinales escogidas. Una Guía de plantas de todo el mundo seleccionadas por su valor terapéutico. 4ª. Edición. Madrid, España: Editorial EDAF S.A.; 2004. Pág. 71-74.
28. Alfredo PP, Anaruma CA, Pião AC, João SM, Casarotto RA. Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: An experimental study. *Ultrasonics.* 2009 May;49(4-5):466-71. Epub 2008 Dec 24.
29. Macêdo SB, Ferreira LR, Perazzo FF, Tavares Carvalho JC. Anti-inflammatory activity of *Arnica montana* 6cH: preclinical study in animals. Original Research Article. *Homeopathy, Volume 93, Issue 2, April 2004, Pages 84-87.*
30. Guido Lyß, Alexander Knorre, Thomas J. Schmidt, Heike L. Pahl, and Irmgard Merfort. The Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactone Helenalin Inhibits the Transcription Factor NF- $\kappa$ B by Directly Targeting p65. *J. Biol. Chem.* 1998 273: 33508-33516.
31. Koch E, Klaas CA, Rüngeler P, Castro V, Mora G, Vichnewski W, Merfort I. Inhibition of inflammatory cytokine production and lymphocyte proliferation by structurally different sesquiterpene lactones correlates with their effect on activation of NF- $\kappa$ B. Original Research Article. *Biochem Pharmacol.* 2001 Sep 15;62(6):795-801.
32. Berges C, Fuchs D, Opelz G, Daniel V, Naujokat C. Helenalin suppresses essential immune functions of activated CD4+ T cells by multiple mechanisms. *Mol Immunol.* 2009 Sep;46(15):2892-901. Epub 2009 Aug 5.
33. Merfort I. *Arnica*: new insights on the molecular mode of action of a traditional medicinal plant. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 2003 Apr;10 Suppl 1:45-8.

34. Tsukamoto T, Chanthaphavong RS, Pape HC. Current theories on the pathophysiology of multiple organ failure after trauma. *Injury*. 2010 Jan;41(1):21-6.
35. Philip F. Stahel, Wade R. Smith, Ernest E. Moore. Role of biological modifiers regulating the immune response after trauma. Original Research Article *Injury*, Volume 38, Issue 12, December 2007, Pages 1409-1422.
36. Andreas Lenz, Glen A. Franklin, William G. Cheadle. Systemic inflammation after trauma. Original Research Article. *Injury*, Volume 38, Issue 12, December 2007. Pages.1336-1345.
37. Granja LA. *Ortodoxia Homeopática*. Indugraf del Ecuador, 1995.
38. Bellavite P. Complexity science and homeopathy: a synthetic overview. *Homeopathy*. 2003 Oct;92(4):203-12.
39. Merrell WC, Shalts E. *Homeopathy*. *Med Clin North Am*. 2002 Jan;86(1):47-62.
40. Hahnemann S. *Órganon de la Medicina*. 2ª edición. México, D.F., 2001: Instituto Politécnico Nacional.
41. Rao ML, Roy R, Bell IR, Hoover R. The defining role of structure (including epitaxy) in the plausibility of homeopathy. *Homeopathy*. 2007 Jul;96(3):175-82.
42. Leon V. *Compendio de materia medica homeopática*. 7ª edición. México: Editorial Porrúa S.A., 1983.
43. Vinosky B. *Tratado de Materia Médica Homeopática*. Buenos Aires: Talleres Gráficos Didot, 1978.
44. Chikramane PS, Suresh AK, Bellare JR, Kane SG. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: A nanoparticulate perspective. *Homeopathy*. 2010 Oct;99(4):231-42.
45. Vélez-Castrillon S, Camargo JF, Correa PA, Anaya JM. Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. *Rev. Colombiana de Reumatología*. 2004 Mar;11(1):11-39.
46. Guajardo G. *Homeopatía académica. Modelos explicativos*. [Consultado el día 14 de junio de 2011]. Disponible en la página web: <http://homeopatiaacademica.webs.com/>
47. Elia V, Napoli E, Niccoli M, Nonatelli L, Ramaglia A, Ventimiglia E. New physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions. A calorimetric and conductivity study at 25\_C. *J Thermal Anal Calorim* 2004;78:331-42.
48. Elia V, Niccoli M. New physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions. *J Thermal Anal Calorim* 2004;75:815-36.
49. Bellavite P, Conforti A, Pontarollo F, Ortolani R. Immunology and homeopathy. 2. Cells of the immune system and inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006 Mar;3(1):13-24. Epub 2006 Feb 5.
50. Bellavite P, Ortolani R, Pontarollo F, Pitari G, Conforti A. Immunology and homeopathy. 5. The rationale of the 'Simile'. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007 Jun;4(2):149-63. Epub 2007 Feb 5.
51. Duff G. Influence of Genetics on Disease Susceptibility and Progression. *Nutrition Reviews*. 2007 Dec;65(12):S177-S181.
52. ABC de la Epigenética. [Consultado el día 17 de julio de 2011]. Disponible en la página web: [www.epigenetica.org](http://www.epigenetica.org).