



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto de árnica en un modelo in vitro con citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Fase II

Libia Adriana Gaona Fernández

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Medicina Alternativa.
Departamento de Bioquímica
Bogotá
2011**

Efecto de árnica en un modelo in vitro con citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Fase II

**Libia Adriana Gaona Fernández
Código: 598603**

**Trabajo de grado para aspirante a título de
Maestría en Medicina Alternativa Area Homeopatía**

Director

Dr. Jorge Eduardo Caminos. Coordinador área bioquímica

Codirector

Dra. Gloria Helena Casas. Médica Homeópata

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Medicina Alternativa.
Departamento de Bioquímica
Bogotá
2011**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Bogotá, septiembre 2011

Este trabajo de grado lo dedico a mi hermano y colega
Fernando Enrique a quien admiro inmensamente ya
que durante el curso de ésta Maestría en Homeopatía,
con fortaleza y entereza soportó y ganó la batalla
por su vida y por esto se convirtió para mí en un gran héroe.
Con profundo aprecio tu hermana mayor Libia Adriana.

Agradecimientos

Agradezco al Doctor Jorge Eduardo Caminos Coordinador del área bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia quien fue el director de mi trabajo de tesis, por haberme dado la posibilidad de participar en este proyecto, de aprender muchísimo porque gracias a sus enseñanzas en el campo de la Biología Molecular su apoyo y guía se pudo llevar a cabo este trabajo de grado.

Agradezco a la Doctora Gloria Helena Casas Médica Homeópata de la Universidad Nacional de Colombia quien fue mi Codirectora de tesis, por su apoyo incondicional, su guía y enseñanza durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a Sandra Perdomo Licenciada en bioquímica, Candidata a doctorado en ciencias biológicas con énfasis en Biología Molecular de la Universidad Javeriana, quien presto el servicio técnico remunerado en el laboratorio de la Universidad Nacional de Colombia quien fue la que llevo a cabo la realización de la investigación en este laboratorio, por su sencillez al explicar y enseñar todo los procedimientos, por su dedicación a este proyecto gracias a lo cual obtuvimos excelentes resultados.

Agradezco a la Maestría de Medicina Alternativa por permitirme estudiar en esta Universidad por su preparación y su búsqueda por ser cada día mejores

Agradezco al Doctor Eduardo Beltrán Médico pediatra subespecializado en Hematología pediátrica, hematooncología pediátrica, por su apoyo, guía y sencillez.

Resumen

La homeopatía tiene varios principios entre ellos: el de la similitud el cual consiste en tratar al individuo con medicamentos similares a los síntomas que expresa el individuo y el otro principio el de la mínima dosis el cual consiste en dar la dosis mínima de ese medicamento[1].

Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son medicamentos que tienen efectos secundarios en los pacientes tratados por diferentes traumas tales como: contusiones, fracturas y esguinces el tratamiento de sus efectos secundarios tienen costos elevados [2].

El Árnica es una planta originaria de Alemania, su flor es la que tiene el principio activo, las Lactonas sesquiterpénicas, se utilizan para el manejo de dolor y trauma como por ejemplo: esguinces, contusiones, fracturas, edema y equimosis. Es analgésica, antiinflamatoria y antiséptica [3].

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio *in vitro* del efecto inmunomodulador del *Arnica montana* sobre el IFN- γ en un cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana sometidas a diferentes diluciones homeopáticas (6 CH, 15 CH, 30 CH, 60 CH, 200 CH y 1000 CH). Se realizó el estudio a partir de sangre periférica de 10 individuos sanos.

El tratamiento de las células mononucleares con *Arnica montana* homeopatizada no es tóxico a las concentraciones trabajadas. En el presente estudio, se observa una buena viabilidad celular a las 48 y 72 horas, la potencia más alta, 1000 CH, a 72 horas tuvo una viabilidad celular de 160 % ($p < 0,05$) comparada contra el control no tratado con el compuesto. La dilución 15 CH presenta mortalidad celular a las 48 horas con todas las dosis con una ($p < 0,05$) estadísticamente significativa. La dilución 6 CH a las 72 horas muestra mortalidad celular ($p < 0,0001$) estadísticamente significativa contrario a lo que se observó a las 48 horas cuando se compara contra el control. El IFN- γ presentó una buena producción en la mayoría de los pacientes con las altas diluciones y con diluciones bajas, solo 2 pacientes no respondieron a la producción de IFN- γ .

El *Arnica montana* homeopatizada *in vitro* nos mostró los principios de la homeopatía porque no es tóxica a mínimas dosis, se cumple el principio de la individualidad, de la semejanza, de la energía vital. Es posible que esta individualidad en la respuesta de cada individuo pueda ser asociada a mecanismos epigenéticos.

Palabras claves: *Arnica montana*, AINES, *in vitro*, Homeopatía, Dilución, IFN γ .

Abstract

Homeopathy has various principles including: the similarity of which is to treat the individual with the symptoms like drugs that expresses the individual and the other principle to be the lowest dose which is to give the lowest dose of the drug[1].

Nonsteroidal anti-inflammatory the analgesics (NSAIDs) are drugs that have side effects in patients treated for various traumas such as bruises, sprains, fractures and treatment of side effects with high costs[2].

Arnica is a plant native of Germany, its flower is the one with the active principle, thesesquiterpene lactones, are used for pain management and trauma such as: sprains, contusions, fractures, swelling and bruising. It is analgesic, anti-inflammatory and antiseptic[3].

The objective of this work is to study *in vitro* immunomodulatory effect of the *Arnica montana* on IFN- γ in a cultured of peripheral blood mononuclear cells subjected to different human homeopathic dilutions (6 CH, 15 CH, 30 CH, 60 CH, 200 CH y 1000 CH). The study was performed from peripheral blood of 10 healthy individuals.

The mononuclear cell treatment with homeopathic *Arnica montana* is not toxic at the concentration worked. In the present study, there is a good cell viability at 48 and 72 hours, the highest power, 1000 CH, 72 hours had a 160% cell viability ($p < 0,05$) compared to the untreated control with the compound. The dilution has 15 CH cell death at 48 hours with all doses ($p < 0,05$) statistically significant 6 CH dilution a 72 hours shows cell death ($p < 0,0001$) statistically significant contrary to what was observed at 48 hours when compared against the control. IFN- γ present the good production in most patients with high dilutions and low dilutions, only 2 patients did not respond to IFN- γ production.

The homeopathic *Arnica montana in vitro* showed us the principles of homeopathy because it is toxic at low doses, is the principle of individuality, of likeness of vital energy. It is possible that this individuality in the response of each individual can be associated with epigenetic mechanisms.

Keywords: *Arnica montana*, NSAIDs *in vitro*, IFN- γ , Homeopathic, Dilution.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Introducción	1
1. Título	3
1.1 planteamiento del problema	3
2 Justificación	5
3 Objetivos	7
3.1 Objetivo general	7
3.2 Objetivos específicos	7
4. Marco teórico-Inflamación	9
4.1 Definición	9
4.1.1 Historia	9
4.1.2 Mecanismo de la inflamación	9
4.2 Células dendríticas	10
4.2.1 Clases	11
4.2.1.1 Células dendríticas mieloides	11
4.2.1.2 Células dendríticas plasmocíticas	11
4.3 Prostaglandinas	12
4.4 Factores de transcripción	12
4.4.1 El factor NFκB	13
4.4.1.2 NF-AT (Factor de transcripción de células T activadas)	13
4.5 Linfocitos T	13
4.5.1 Clases de células T CD4	14
4.5.1.1 Las células Th1	14
4.5.1.2 Las células Th2	14
4.5.1.3 Las células T reguladoras o supresoras	14
4.5.1.4 Las células Th 17	15
4.5.1.5 Las células Th0	15
4.5.2 Linfocitos T en el trauma	16
4.6. Citoquinas	16
4.6.1 Funciones	16
4.6.2 Clases	17
4.6.2.1 Interleuquina – 2 (IL-2)	17
4.6.2.2 Interleuquina -6 (IL-6)	17
4.6.2.3 Factor de necrosis tumoral alfa (TNFα)	17
4.6.2.4 Interferón gamma (IFNγ)	18
4.6.2.5 Interleuquina 10 (IL-10)	18

4.6.2.6 Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β)	18
4.7 Epigenética	19
4.8 Genómica	19
4.9 Antiinflamatorios no esteroideos (aines)	19
5. <i>Arnica montana</i>	21
5.1 Generalidades	21
5.2 Mecanismo de acción molecular del <i>arnica montana</i>	22
5.3 Farmacopea del <i>arnica montana</i>	23
5.4 Materia médica del <i>arnica montana</i>	23
6. Homeopatía	24
6.1 Definición	24
6.2 Principios y leyes de la homeopatía	26
6.2.1 Principio de la energía vital	26
6.2.2 Ley de la semejanza	26
6.2.3 Principio de la dosis mínima	26
6.2.4 Ley de la individualidad	26
6.2.5 Experimentación pura	26
6.2.6 Acción y Reacción	27
6.2.7 Ley de la curación o del orden	27
6.2.8 El principio del remedio único	27
6.2.9 La teoría del miasma	27
6.3 Potencia y su acción biológica	28
7. Diseño metodológico	28
7.1 Tipo de estudio	29
7.2 Compuesto	29
7.3 Obtención de células mononucleares	29
7.4 Ética	31
7.4.1 Aspectos éticos	31
7.5 Análisis estadístico	32
8. Resultados	33
9. Discusión y conclusiones	33
9.1 Recomendaciones	37
Anexo A. Procedimiento para obtener células mononucleares	39
Anexo B. Procedimiento para obtener elisa	41
Anexo C. Consentimiento informado	42
Bibliografía	43
	51

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1A Efecto <i>in vitro</i> de <i>Árnica montana</i> homeopatizada en células mononucleares de sangre periférica 48 horas	44
Figura 1B Efecto <i>in vitro</i> de <i>Árnica montana</i> homeopatizada en células mononucleares de sangre periférica a las 72 horas	45
Figura 2A Efecto <i>in vitro</i> de <i>Árnica montana</i> homeopatizada sobre los niveles de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos del 1 al 5	46
Figura 2B Efecto <i>in vitro</i> de <i>Árnica montana</i> homeopatizada sobre los niveles de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos del 6 al 10	47

Glosario

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ASA: ácido acetil salicilico

ANOVA: análisis de varianza

AP-1: activador de la proteína 1

CH: centesimal Hahnemaniana

C12: centesimal 12

C9: centesimal 9

6 CH: 6 centesimal Hahnemaniana

15 CH: 15 centesimal Hahnemaniana

30 CH: 30 centesimal Hahnemaniana

60 CH: 60 centesimal Hahnemaniana

200 CH: 200 centesimal Hahnemaniana

1000 CH: 1000 centesimal Hahnemaniana

24X: 24 decimal

D4: decimal 4

24D: decimal 24

COX-1: ciclooxigenasa 1

COX-2: ciclooxigenasa 2

DMSO: dimetilsulfóxido

ELISA: enzyme-linked inmunosorbent assay (ingles).

ELISA: análisis por inmuoadsorción con enzimas ligados (español)

GMCSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

G1/S: transición entre fase G1 y fase S del ciclo celular

HLA-DR: moléculas de histocompatibilidad de clase II.

HOMBREX: base de datos en ensayos básicos de investigación en homeopatía

IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

IFN- γ : interferón gama

IFNs: Interferones

I κ β : proteína inhibitoria kappa β

IL-1 β : interleuquina 1 β

IL -1: interleuquina 1

IL-2: interleuquina 2

IL-6: interleuquina 6

IL-8: interleuquina 8

IL 10: interleuquina 10

IL-12: interleuquina 12

IL-17: interleuquina 17
INO: óxido nítrico sintetasa
IP₃: fosfatidilinositol
LPS: lipopolisacaridos
L.M.: cincuentamilesimal
LTA₄:leucotrieno A₄
MESH: medical subject headings
MHC tipo I: complejo mayor de histocompatibilidad tipo I
MHC tipo II: complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
MMT:(Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico)
NFκβ: factor de transcripción kappa β
NF-AT: factor de transcripción de células T activadas
NKT: cell natural Killer
PCR:proteína C reactiva
PGD₂:prostaglandina D₂
PGE₂:prostaglandina E₂
GF_{2α}:prostaglandina F_{2α}
PGH₂:prostaglandina H₂
PGI₂:prostaciclina I₂
PKC: proteínakinasa C
RNA:ácidoribonucleico
RNA m: ácido ribonucleico mensajero
RPMI: roswell park memorial institute medium
SAPEH: puntuación para la evaluación de los experimentos de física en homeopatía
SIRS: respuesta inflamatoria sistémica
SNC: sistema nervioso central
SSRIs: inhibidores selectivos de la recaptación con serotonina
TCR: receptor de antígeno de células T
TGF-β: factor de crecimiento transformante Beta
TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa
Th1:células T helper tipo 1
Th2:células T helper tipo 2
TLR: receptors toll like
TLR1: receptor toll like 1
TLR9: receptor toll like 9
TXA₂:tromboxano A₂

Introducción

La homeopatía desde que la fundó Hahnemann en 1796 surgió como oposición al reduccionismo de la medicina de la época, se centra en el ser humano como ser individual le da un valor especial a sus sentimientos y emociones[4].

Según Hahnemann el miasma es una enfermedad crónica y cada individuo tiene una forma de enfermar, es una alteración a la fuerza vital un obstáculo a la curación. Kent también describió su teoría de los miasmas y durante varios años hasta la modernidad varios autores se han dedicado a explicar los miasmas en nuestra actualidad Flores y Béjar la han descrito desde el punto de vista de celular y bioenergético [5].

Lo que se conoce como miasma en la actualidad son numerosas patologías diferentes en las que influyen múltiples genes y factores epigenéticos tales como: alcohol, dieta, tóxicos e.tc. No se debe limitar los modos reaccionales a un tipo o clase de herencia, se debe discutir cada cuadro clínico individualmente y definir su modo reaccional o mecanismo de reparación[6].

En el presente trabajo se estudia el Efecto *in vitro* de *Arnica montana* homeopatizada sobre los niveles de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos.

1. Titulo

Efecto de *Árnica* en un modelo *in vitro* con citoquinas pro inflamatorias y antiinflamatorias. Fase II.

1.1 Planteamiento del problema

Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son medicamentos que tienen efectos secundarios en los pacientes tratados por diferentes traumas tales como: contusiones, fracturas y esguinces el tratamiento de sus efectos secundarios tienen costos elevados [2]. El uso crónico de los AINES para tratar la inflamación puede exacerbar esta. Hahnemann ya lo había dicho, el uso de medicamentos paliativos para enfermedades crónicas lleva a un efecto rebote, cada vez se necesitan mayores cantidades de paliativos para contrarrestar el efecto. En un estudio reciente con voluntarios sanos a los cuales se les administro una dosis diaria de aspirina 325 mg o 200 mg de ibuprofeno por 12 días, se apoyó esta teoría del efecto rebote del uso crónico de AINES, a los pacientes se les midieron las citoquinas pro inflamatorias (ex vivo) las cuales se encontraron elevadas 2 a 3 semanas época en la que ya fue eliminado el medicamento, se les volvieron a medir nuevamente a las 7 semanas de suspendido la aspirina y a las 5 semanas de suspendido el ibuprofeno encontrándose las citoquinas en valores normales [5].

Los estudios que se han realizado con *Arnica montana* consisten en comparar diferentes diluciones de Arnica montana 30CH, 6CH comparada con AINES en pacientes a quienes les realizaron cirugía del túnel carpiano en manejo de dolor y edema pero no se han realizado estudios de la respuesta inmunomoduladora de las citoquinas tales como IFN- γ [7].

2. Justificación

El *Arnica montana* es una planta originaria de Alemania, su flor es la que tiene el principio activo, las Lactonas sesquiterpénicas, se utilizan para el manejo de dolor y trauma como por ejemplo: esguinces, contusiones, fracturas, edema y equimosis. Es analgésica, antiinflamatoria y antiséptica [3].

La base de datos en ensayos básicos de investigación en homeopatía (HomBrex), realiza búsquedas sistemáticas de datos bibliográficos y tamizaje. Hasta diciembre de 2006 contenía más de 1100 experimentos reportados y cerca de 900 artículos originales, entre los artículos hay algunos con un experimento y otros con varios experimentos. También se dividieron los estudios en dos: los que estaban por encima del número de Avogadro (alta dilución) y los que estaban bien lejanos al número de Avogadro (ultradilución) (D24 o C12) [8]. Se realizaron 475 estudios *in vivo* de los cuales 106 fueron en humanos donde se encontró 63 estudios con baja dilución y 45 con alta dilución; 257 estudios *in vitro* de los cuales 15 fueron en humanos, donde se encontró 8 con baja dilución y 7 con alta dilución y por último reportaron estudios experimentales donde se encontró 397 estudios de los cuales 42 fueron en humanos donde se encontró 24 con alta dilución y 18 con baja dilución [8]. Los estudios en humanos realizados para investigación *in vitro* e *in vivo* han sido en fisiología, inmunología y biología molecular. Y en estudios experimentales han sido en fisiología e inmunología [8]. De los estudios realizados con *Arnica montana* *in vivo* fueron 3, *in vitro* fueron 2 y experimentales no se encontraron estudios [8].

Claudia M. Witta, Michael Bluth y et al, realizaron una revisión sistemática de la literatura del efecto de las altas potencias *in vitro* en homeopatía. Utilizaron las referencias de la base de datos de la investigación básica de la fundación Karl and Verónica Carstens-Foundation, D-Essen, realizaron la búsqueda en Medline desde 1966 hasta diciembre de 2005 y Amed. (Allied and Medicina Alternativa) desde 1985 hasta diciembre de 2005, se utilizó términos MESH tales como: "homeopatía" combinado con cada uno de los siguientes términos "in vitro", "cultivo celular", "cultivo de tejidos", "células cultivadas", "granulocitos", "Linfocitos", "macrófagos", "neutrófilos", "Basófilos", "enzimas", "biomoléculas", "inmunocompetentes". Se obtuvieron publicaciones de las citaciones de los artículos principales, de expertos, conferencias, trabajos de grado, se incluyeron todos los idiomas. Se realizó la evaluación modificada SAPEH (puntuación para la evaluación de los experimentos de física en homeopatía). Se modificó para evaluar los experimentos en homeopatía esta mide tres parámetros: metodología, estandarización del experimento y presentación este se divide en 8 puntos. El

resultado de la búsqueda encontró 75 publicaciones, de 67 experimentos 1/3 fueron repeticiones de los anteriores, 3/4 de los experimentos se identificaron con un efecto de alta potencia, 2/3 de los 18 con los controles sucucionados. Cerca de 3/4 de todas las repeticiones fueron positivas. Se encontró que los sistemas investigados fueron 42% basófilos, 19% cultivo celular, 6% linfocitos, 3% neutrófilos, 3% eritrocitos y 27% sistema no celular. Los autores concluyeron: 1. la aplicación de un puntaje para evaluar sistemáticamente las publicaciones no es común en la investigación básica en homeopatía tiene limitaciones, lo utilizaron para ser transparentes en la toma de los criterios, 2. El sesgo inconsciente se extiende en la falla humana o la manipulación, 3. Se rige la investigación básica de acuerdo a la técnica de Hahnemann (varias potencias en varios frascos), 4, los contaminantes más probables son: las manos, el uso de un segundo remedio como control con una baja dilución, 5. los estudios in vitro realizados en homeopatía no son homogéneos en el diseño y la calidad y 6. Se deben realizar más repeticiones de forma independiente para establecer modelos que sean estables a través de laboratorios y equipos [9].

Los antiinflamatorios no esteroideos son los analgésicos más utilizados para manejo de dolor muscular, articular y edema secundario a trauma. Los efectos secundarios se observan en el tracto digestivo con hemorragia de vías digestivas altas y bajas, interacción medicamentosa con los antihipertensivos. El paciente puede llegar hacer hospitalizado y los costos de su tratamiento son de 37,6 mil millones de dólares en el cuidado de la salud este resultado lo dieron a conocer en un estudio en Canadá [2]. En cambio el *Arnica montana* es 60% más económica que el diclofenaco[10].

En modelo animal se han hecho estudios con *Arnica montana* D4 donde se miró el efecto sobre la inflamación y no se observó un papel claro de este tratamiento. En el mismo estudio recomiendan más estudios profundos ya que el modelo que emplearon no fue el más apropiado para demostrar este efecto por otro lado no hacen ninguna medida del efecto inmunomodulador del *Arnica montana*[11].

En el presente estudio se pretende realizar un estudio *in vitro* para demostrar el efecto inmunomodulador del *Arnica montana* homeopatizada en células mononucleares a diferentes diluciones (6CH, 15CH, 30CH, 60CH, 200CH y 1000CH) sobre la citoquina IFN- γ [7].

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Estudio de la respuesta inmunomoduladora de *Arnica montana* homeopatizada en un cultivo de células mononucleares humanas.

3.1 Objetivos específicos

Estudiar el efecto inmunomodulador de *Arnica montana* homeopatizada en un cultivo de células mononucleares humanas, sobre la Interleuquina Interferón gamma (IFN- γ).

Estudiar el efecto inmunomodulador a diferentes diluciones de *Arnica montana* homeopatizada en un cultivo de células mononucleares humanas.

Estudiar el efecto inmunomodulador del tratamiento con *Arnica montana* homeopatizada en un cultivo de células mononucleares humanas mediante ELISA.

4. Marco Teórico Inflamacion

4.1 DEFINICIÓN

La inflamación es una respuesta de defensa del organismo contra una infección o trauma en el cual hay una respuesta de defensa del sistema inmune para defender a este organismo y mantener su equilibrio[12].

4.1.1 Historia

La inflamación es de gran interés para la humanidad y se le nombra desde la antigüedad. Celsus médico romano, siglo primero antes de Cristo, fue el primero que escribió y observó el proceso de inflamación, el describió cuatro signos cardinales de la inflamación: Rubor, tumor (edema), calor y dolor. Augustus Waller, en 1846 y Julius Conheim, en 1867 descubrieron la migración leucocitaria desde los vasos sanguíneos. Este último observó la vasodilatación, migración leucocitaria y exudados del plasma fuera de los vasos sanguíneos en tejidos vecinos. Rudolf Virchow, el adicióno el quinto signo cardinal, disturbio de la función (Funtionlaesa) en su libro patología celular. El estableció las bases celulares patológicas de la inflamación. Elie Metchnikoff, descubrió la fagocitosis en 1892 y desarrollo la teoría de inmunidad celular. Señalo el papel clave de los macrófagos y microfagos (neutrófilos) en la defensa del huésped y el mantener la homeostasis. Paul Ehrlich, desarrollo la teoría de la inmunidad celular. Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato en 1890. Jules Bordet en 1896, descubrió el complemento. Robert Koch y Louis Pasteur, a finales de siglo 19, establecieron la teoría del germen como enfermedad [12].

4.1.2 Mecanismo de la inflamación

Hay 4 componentes que median el proceso de la inflamación: 1) el inductor de la inflamación, 2) los sensores que detectan la inflamación, 3) mediador que induce la inflamación y 4) el órgano blanco afectado por la inflamación [12].

El trauma y su lesión asociada a los tejidos perturban tanto la inmunidad innata como la adaptativa, permitiendo la inmunidad innata inicial responder a una lesión y una respuesta inmune antiinflamatoria desarrollada asociada con la supresión de la inflamación (12).

La respuesta inflamatoria sistémica hace parte de la rama innata del sistema inmunológico y es la encargada de la respuesta hiperinflamatoria. Después de un trauma hay inflamación y daño de tejidos, así se inicia de inmediato una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en la que se aumenta la temperatura corporal y hay taquicardia. En el momento del trauma se activa la cascada de la coagulación la cual causa la liberación de proteínas de fase aguda, proteínas de complemento y citoquinas pro inflamatorias que estimulan la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos. Los neutrófilos se incrementan en número y función en la circulación[13].

Las citoquinas inflamatorias en cantidades suficientes tienen efectos sistémicos, estimulan los hepatocitos los cuales liberan Proteína C reactiva y factores de la coagulación activando prostaglandinas en el endotelio cerebral y neuronas del SNC, produciendo en el paciente síntomas como: fiebre, anorexia, fatiga y aislamiento social [12].

En el momento del trauma las células T autoreactivas se encuentran en la circulación se activan y proliferan cuando reconocen la presencia de auto antígenos liberados por tejidos dañados ayudando así a su eliminación [14].

La respuesta antiinflamatoria sistémica hace parte de la rama adaptativa del sistema inmunológico y es la encargada de la respuesta hipo inflamatoria. El síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria se caracteriza por una disminución en la expresión en los monocitos de antígenos leucocitarios humanos tipo DR (HLA-DR) o expresión in vivo de la producción de TNF- α . Esté se caracteriza por una respuesta embotada a las infecciones, debido a una disminución del número de células T y falta de respuesta mitogénica. Esta disminución de las células T predispone al paciente con trauma a infección nosocomial, sepsis y disfunción de múltiples órganos[13].

4.2 Células dendríticas

Las células dendríticas se originan de células progenitoras hematopoyéticas. Son una familia de células presentadoras de antígenos profesionales las cuales se especializan en captar y procesar antígenos para presentarlos a los linfocitos, en su estado inmaduro se encuentran localizadas en sitios estratégicos en las puertas de entrada de patógenos tales como: tejidos periféricos y mucosas. Son activadas por agentes microbianos, células muertas, células del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo [15, 16].

Las células dendríticas son primordiales para inducir respuesta inmune adaptativa. Las células dendríticas en su estado inmaduro reconocen los patógenos por los receptores Toll like (TLR) estos receptores activan las células

dendríticas estas fagocitan y procesan los péptidos de los antígenos microbianos u otros antígenos los cuales se unen a los complejos Mayores de Histocompatibilidad tipo I y II estos se trasladan a la membrana plasmática en vesículas. Durante este proceso de migración van madurando y pasan de ser células captadoras de antígenos a células presentadoras de antígenos hasta llegar a los ganglios linfáticos donde presentan los complejos MHC tipo I y II, glicolípidos, glicopéptidos a las células T CD4 vírgenes, NKT y células B [15, 17]. Las células dendríticas son primordiales para la activación de linfocitos TCD4 vírgenes e inducen su diferenciación en linfocitos T efectores y diferenciación en Th1 y Th2 [17].

La capacidad que tienen las células dendríticas de T priming es estrictamente dependiente de la activación mediada por citoquinas pro inflamatorias tales como IL -1,TNFalfa,IL-6 como, prostaglandinas, así como productos de activación del receptor TLR producido por el mismo patógeno, además después de exponerse a estas citoquinas y productos microbianos, las células dendríticas regulan moléculas co estimuladoras (CD40,CD80,CD86) y la producción de citoquinas (IL-1.TNFalfa e IL-12) y migran al área de células en tejidos linfoides[15, 16].

4.2.1 Clases

Los subtipos de las células dendríticas se derivan de las células hematopoyéticas en células mieloides y plasmocíticas [15].

4.2.1.1 Células dendríticas mieloides

Se encuentran en tres compartimientos tales como: tejidos periféricos, órganos linfoides secundarios y sangre. En la piel hay 2 tipos de células dendríticas mieloides se encuentran en dos capas distintas. Las células de Langerhans residen en la epidermis y expresan CD1a y Langerin. Las células dendríticas intersticiales residen en la dermis y expresan DC-SIGN y CD14. En la sangre expresan TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10 pero no TLR9 [15].

4.2.1.2 Células dendríticas plasmocíticas

Circulan en la sangre y órganos linfoides secundarios cruzando altas vénulas endoteliales, expresando BDCA2, ILT-7 y CD123 y secreta grandes cantidades de interferones tipo I (IFNs) en respuesta a virus y/o TLR 7-9 ligados. las células dendríticas plasmocíticas en sangre expresan TLR1, 6,7,9 y 10 pero no TLR 4[15, 16].

4.3 Prostaglandinas

Las prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, lipoxinas son derivados del ácidoaraquidónico almacenado en fosfolípidos[18]. Los eicosanoides, como: los leucotrienos y prostaglandinas son potentes mediadores lipídicos, implicados en la respuesta inflamatoria, fisiológica y patofisiología [18]. Las células mieloides son las únicas que tienen alta cantidad de ácidoaraquidónico esterificado y enzimas necesarias para metabolizar ácidoaraquidónico libre dentro de diferentes productos en la vía de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa [19]. Los leucocitos polimorfonucleares liberan ácidoaraquidónico en respuesta a ligandos de receptores, son las primeras células sanguíneas en migrar dentro del tejido siguiendo la invasión microbiana [19]. La liberación de PGE₂ en la piel después de un estímulo tóxico produce edema local e hiperalgesia[20].

Actualmente por medio de varios estudios encontraron que es una biosíntesis transcelular, se define como la vía transcelular de la biosíntesis de eicosanoides, y se requiere de una célula donadora para sintetizar y liberar componentes de la cascada biosintética, y una célula aceptora para tomar la intermediación y proceso final del producto biológicamente activo. Un estímulo en el medio celular puede alterar cualitativamente y cuantitativamente la producción de eicosanoides, puede hacer que haya un cambio en la producción enzimática un ejemplo puede ser un estímulo quimiotáctico puede convertirse en un estímulo vasoactivo [18].

En el metabolismo del ácidoaraquidónico se involucran compuestos biológicamente activos, la actividad secuencial de numerosas enzimas muestra un perfil único en diferentes células, las principales vías metabólicas conocidas son las ciclooxigenasas y la 5 lipooxigenasa ambas generan intermediarios químicos inestables: prostaglandina H₂ (PGH₂) y leucotrieno A₄ (LTA₄), estos son transformados por enzimas secundarias dentro de una variedad de estructuras químicas conocidas colectivamente como lípidos mediadores. Se creía que la formación de mediadores lipídicos prostaglandinas y leucotrienos era lineal, todo el proceso se producía en una célula [18].

4.4 Factores de transcripción

Diferentes vías de señalización son activadas por varios agentes infecciosos tales como: bacterias, virus, hongos, parásitos; otras como: traumas, tumores, enfermedades crónicas (diabetes, obesidad, asma, enfermedades neurovegetativas) [12].

4.4.1 NF κ B (Factor de transcripción kappa β)

El factor de transcripción kappa β (NF- κ B) es una proteína conformada por 2 subunidades la p50 y la p65, la cual está inactiva en el citoplasma al estar unida a la proteína inhibitoria kappa β (I κ B), el factor de transcripción NF- κ B se activa por infecciones virales y bacterianas liberándose de la subunidad I κ B por fosforilación, ubiquitinación, el factor activado se trasloca al núcleo donde estimula la activación de la transcripción de sus genes Diana tales como la interleuquina 1 (IL-1), la interleuquina 2(IL-2), la interleuquina 6 (IL-6) y la interleuquina 8, el TNF- α y otros genes que codifican la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la enzima óxido nítrico sintetasa, factor de crecimiento hematopoyético y receptores de crecimiento [21, 22].

4.4.1.2 NF-AT (Factor de transcripción de células T activadas)

El factor de transcripción NF-AT es una proteína determinante en la activación o no de las células T. Hay diferentes clases de NF-AT expresados en diferentes tipos celulares del sistema inmune tales como: 1) NF-AT- 1: se encuentra en monocitos y macrófagos, células mastocitas, eosinófilos, células B, células T, células NK. 2) NFAT-2: se encuentra en basófilos, células mastocíticas, células B, células T, células NK. (Natural killer). 3) NFAT-3: se encuentra en células del sistema inmune su transcripción del RNA m se expresa en la sangre periférica y 4) NFAT4 y NFAT5: su RNA m se expresa en niveles significativos en timo y linfocitos periféricos [23].

El NF-AT se encuentra en el citoplasma inactivo tiene un dominio regulatorio N terminal el cual se encuentra fosforilado. El receptor TCR depende de la generación de Fosfatidilinositol (IP₃) activa los canales de calcio de retículo endoplasmático produciendo la salida de calcio al citoplasma y el calcio intracelular liberado activa la calcineurina la cual desfosforila el NF-AT. El NF-AT se trasloca al núcleo donde se une al activador de la proteína 1(AP-1) donde activa la transcripción de genes diana [23]. Entre los genes que transcribe se encuentra el de la IL-2, IL-3, Interferón gama (IFN γ), TNF α , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y COX 2 [24, 25].

4.5 Linfocitos T

Las células T inmaduras migran desde la medula ósea al timo, en este sitio comienza a expresar receptores para antígenos la mayoría de los receptores tienen 2 cadenas α y β [26].

Las células T se estimulan a través del receptor de antígeno de células T (TCR), una co estimulación positiva a través de CD28, con una posterior cascada de transducción de señales que incluyen varios receptores, movilización intracelular de calcio inducida por segundos mensajeros la activación de la Protein Kinasa C (PKC) intracelular, con la translocación al núcleo de factores de transcripción como NF- κ B, NF-AT, que a su vez crean sinergias para regular la expresión de cientos de genes [23].

Las Células T CD4 juegan un papel importante en la promoción y detección de la inflamación mediante la secreción de citoquinas pro inflamatorias y antiinflamatorias [14]. El criterio de categorización de citoquinas depende de la producción de citoquinas sobre distintos linajes de células T helper [27]. Se diferencian en células efectoras y subconjuntos regulatorios que constituyen la base para la inmunidad adaptiva, este evento primario se origina en las interacciones entre células Th vírgenes y células dendríticas [23, 28].

4.5.1 Clases de células T CD4

Se encuentran las 2 clásicas las células T helper Th1 y Th2 ,las Th0, las células T clonadas que exhiben el perfil diferente de citoquinas Th1 yTh2 entre las que encontramos a las células T reguladoras tales como: las T reguladora-1 (Tr-1) y la natural T reguladora -3 (Tr-3 o Th3) y la Th17 [14, 27].

4.5.1.1Las células Th1

Secretan citoquinas pro inflamatorias tales como: IFN γ , GM-CSF, IL-3, TNF α , IL-15 e IL-2 [14, 27, 28].

4.5.1.2 Las células Th2

Secretan citoquinas antiinflamatorias tales como: GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9,IL- 10 e IL- 13 [14, 28]. Ambas células Th1 y Th2 secretan IL-10 [14].

4.5.1.3Las células T reguladoras o supresoras

Encontramos la CD4 y CD25, las células CD25 constituyen el 1 al 2% del total de la población de células T CD4. En ratones las células T CD4 vírgenes expresan la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) mientras que en los humanos la previa exposición a los autoantigenos del medio ambiente las células TCD4 expresan elevadísimos niveles de CD25 en la superficie celular [29].

Su principal función es el mantenimiento de la auto tolerancia a través de la inhibición de las células T efectoras también Inhiben la iniciación y desarrollo de

determinadas respuestas inmunológicas de las células y son consideradas antiinflamatorias [14, 27].

Hay varios subconjuntos de células T reguladoras:

- **Las células T reguladoras tipo 1 (Tr-1)**

Las IL-2 e IL-4 son las productoras de grandes cantidades de IL-10, secretan IFN γ , IL-5, y bajos a moderados niveles de factor transformante beta (TGF- β) [14, 27].

- **Las células T reguladoras tipo Tr3 o células Th3**

Se caracterizan por la expresión de moléculas CD4 y CD25, su desarrollo y función dependen de la expresión del factor de transcripción forkhead box p3 (Foxp3). Producen grandes cantidades de TGF- β y bajas cantidades de IL-10. Las citoquinas regulatorias IL-10 y TGF- β suprimen la respuesta inmune patológica que ocurre en enfermedades autoinmunes y trasplantes. IL-10 y TGF- β regulan negativamente la producción de citoquinas Th1 y Th2 [17, 27].

- **Las células T reguladoras inducibles**

Pueden tomar varias formas no son claras en términos de fenotipos o función, se cree que controlan la inflamación excesiva por producción de grandes cantidades de IL-10 y factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β) [17].

4.5.1.4 Las células Th 17

Secretan la IL-17 que es pro inflamatoria también secretan IL-17F, IL-22e IL-25, IL-6, TNF α y algunas de ellas IFN- γ [27].

4.5.1.5 Las células Th0

Conocidas como células maduras, secretan citoquinas de ambos tipos Th1 y Th2 [27].

4.5.2 Linfocitos T en el trauma

En el estudio realizado por Kasten y colaboradores hallaron que durante el trauma se puede disminuir el número de células T la posible razón podría ser los efectos de transfusión, dilución desde la resucitación y movimiento desde la periferia, basados en muchos estudios ellos creen que la apoptosis es la causa subyacente de la declinación de las células T vírgenes, el resultado final de la apoptosis masiva de células T podría favorecer la pérdida de la capacidad del TCR de responder a infecciones posteriores junto con la producción de mediadores antiinflamatorios por macrófagos durante la fagocitosis de cuerpos apoptóticos. También la deficiente señalización del receptor TCR puede resultar en la disminución de la producción de citoquinas por las células T [13].

Durante el trauma el número de células T vírgenes CD4 y CD8 se disminuyen en la circulación periférica. La lesión lleva a una depresión significativa en la capacidad de las células T CD4 para producir citoquinas tipo Th1 como se demuestra por la reducción dramática de anticuerpos anti CD3/CD28 los cuales son estimulados para la producción de citoquinas Th1 y Th2. Los linfocitos T reguladores adquieren la capacidad incrementada para suprimir la producción de citoquinas tipo Th1 que secreta el IFN- γ y produce altos niveles de citoquinas tipo Th2 con la secreción de IL-4,5 y 10 [13].

4.6 Citoquinas

Se descubrieron a mediados del siglo pasado gracias al descubrimiento del Interferón (IFN) (Isaac and Lindenmann, 1957) [27].

Las citoquinas son polipéptidos de pequeños a medianos tamaños o glicoproteínas (6-30 KDa). las cuales son producidas por varias células entre ellas los linfocitos T, células dendríticas y macrófagos [27].

4.6.1 Funciones

Las citoquinas tienen múltiples funciones en la regulación homeostática, se producen en baja cantidad y tienen expresión transitoria dependiendo del estímulo. La función inmune de las citoquinas resulta de la acción coordinada de las células T, macrófagos y células dendríticas dependen en gran medida de su reclutamiento en el sitio de la infección, inflamación, y otras lesiones patológicas, el tráfico de las células inmunes a los sitios de infección y la inflamación es bajo un estricto control de una clase especial de citoquinas con propiedades quimioatrayentes (quimioquinas) [27].

Pueden actuar de forma autocrina (actúan en la misma célula), paracrina (actúan en células vecinas) y endocrina (actúan en células lejanas) [27].

Entre sus diferentes acciones se encuentran: 1) Pleitropismo: citoquinas individuales que poseen múltiples funciones regulatorias. 2) Redundancia: los efectos biológicos de varias citoquinas son frecuentemente superpuestos y 3) Antagonismo y Sinergismo : una serie de mecanismo influncian la producción y activación de miembros individuales de las citoquinas vecinas [27].

4.6.2 Clases

4.6.2.1 Interleuquina – 2 (IL-2)

El gen que transcribe la IL-2 estimula al TCR, esta interleuquina se une a su propio receptor para aumentar la fase G1/S del ciclo celular resultando en la expansión nuclear y diferenciación celular [30]. La activación de células T CD4 y células T coestimuladoras conducen a un aumento de la producción de IL-2. El antígeno específico de células T puede proliferar o producir interleuquina 2 [31].

El factor nuclear de las células T activado (NF-AT) se presenta en complejo con el activador de la proteína – 1(AP-1), con las células B y macrófagos está en la transcripción de los genes mediadores de la inflamación como IL-2,IL-3, IFN- γ y TNF- α [3].

4.6.2.2 Interleuquina -6 (IL-6)

Es una citoquina pleiotrópica. Presente en respuestas agudas y contribuye tanto síntomas locales como sistémicos (8).

Media la función de las citoquinas pleiotrópica, induce una respuesta inflamatoria sistémica (fiebre anemia, aumento de producción hepática de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, PCR), madura y activa linfocitos T, B y los macrófagos[32].

4.6.2.3 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)

Es sintetizado en la microglia, astrocitos y algunas poblaciones de neuronas. Es una potente citoquina pro inflamatoria, juega un papel importante en la iniciación de la cascada de activación, es uno de los principales activadores de otras citoquinas y factores de crecimiento en la respuesta inflamatoria. Este tiene varias

funciones en el sistema nervioso central entre ellas la activación microglial, activación de astrocitos, regulación de la barrera hematoencefalica, respuesta febril, transmisión glutamatergica y plasticidad sináptica. El TNF α activa al inhibidor I κ β por medio del complejo I κ β Kinasa (IKK) [33].

4.6.2.4 Interferon gamma (IFN γ)

Lo producen las células T CD4 tipo Th1, es una potente citoquina pro inflamatoria[14]. El gen de IFN- γ contiene un sitio potencialmente funcional en NF- κ β [14].

El IFN- γ es un potente activador de los neutrófilos y macrófagos y desempeña un papel clave contra las infecciones. Mejora la función de los macrófagos, y ayuda a la expansión de células T mediante la secreción de IL-2 en las primeras etapas de la inflamación. Otra de sus funciones es disminuir la producción de células T, lleva a la apoptosis de células T la cual produce inmunosupresión por perdida del receptor TCR, y de esta manera sirve para limitar la activación innata del sistema inmune [13].

4.6.2.5 Interleuquina 10 (IL-10)

La IL-10 produce maduración de células dendríticas, células T CD4 y macrófagos[12, 34].

La IL-10 se aumenta después del trauma, es una de las citoquinas antiinflamatorias claves encargada de suprimir citoquinas pro inflamatorias, quimioquinas y la producción de moléculas inflamatorias como: TNF α , IFN γ e IL-12, IL-6, MCP-1, metabolismo de óxido nítrico, moléculas de complejo de histocompatibilidad mayor e inhibe sus antígenos específicos de células T citotóxicas. Entre otras de sus funciones está la de disminuir la producción de neutrófilos. Su baja producción produce sepsis y síndrome de disfunción orgánico múltiple, además pierde su capacidad de disminuir la inflamación [34, 35].

4.6.2.6 Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β)

El TGF- β es una citoquina que inhibe la inflamación y promueve la remodelación de tejidos después de una lesión, inhibe la respuesta de los macrófagos a los lipopolisacaridos (LPS) y Esta promueven la secreción de reactantes de fase aguda y citoquinas inflamatorias por células hepáticas predisponiendo a hipotensión y shock endotoxemico [36].

El incremento de TGF- β lleva a la producción aumentada de IL-6 y TNF- α estas promueven la respuesta de la fase aguda formando un feedback positivo cooperando en una sobre regulación de proteínas en fase aguda. Los hepatocitos podrían cuantificarse por la exagerada secreción de IL-6 durante la respuesta de la fase aguda que promueve la TGF- β . Estos resultados subrayan el papel del hígado en la respuesta de fase aguda e inflamación sistémica no solamente por secretar reactantes en fase aguda sino que es uno de las mayores fuentes de citoquinas [36].

4.7 Epigenética

Consiste en el estudio de los cambios hereditarios en función de genes que se producen sin un cambio en la secuencia del ADN tales cambios pueden ocurrir a través de los mecanismos tales como: la metilación del ADN, modificaciones en la estructura de la cromatina e interferencia del RNA. La epigenética tiene en cuenta los efectos del medio ambiente sobre los patrones de expresión génica que se pueden pasar junto a las células hijas [37].

4.8 Genómica

Se refiere al estudio de todos los genes de una célula o tejido. Cada individuo responde de manera diferente al riesgo de exposición e intervención. La secuencia del ADN del genoma humano y la función individual de genes y sus variantes hace posible identificar a los individuos en riesgo de una condición médica o de respuesta a una intervención particular [37].

4.9 Antiinflamatorios no esteroideos (aines)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), son medicamentos que se usan como analgésicos, para el manejo del dolor, la inflamación y la fiebre. Como por ejemplo: espasmos musculares, mialgias, artralgias y artritis. [2, 38].

Los AINES previenen la formación de mediadores lipídicos, producción de prostaglandinas (PGE₂), son inhibidores no selectivos de ambas isoenzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 de esta manera previenen la formación de todas las prostaglandinas cuya función es producir, dolor, inflamación y fiebre [38].

Convierten el ácido araquidónico libre en intermediarios de endoperóxido inestable prostaglandina H₂ (PGH₂) este es un sustrato para las enzimas de la COX que

conducen a la formación prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prostaciclina I₂ (PGI₂) y tromboxano A₂ (TXA₂). Entre los efectos secundarios de los AINES se encuentran los siguientes a continuación: 1) a nivel gástrico: La hemorragia de vías digestivas altas en los pacientes se asocia con la edad, uso de prednisolona, previo sangrado gastrointestinal, y anticoagulación. El sangrado gastrointestinal bajo puede ser por ulcera del colon, enfermedad diverticular, y el uso de Ácido Acetil Salicílico como cardioprotector puede producir tanto hemorragia de vías digestivas altas como bajas. El sangrado del intestino delgado es casi imperceptible. También el tomarlo en conjunto con inhibidores selectivos de la recaptación con serotonina (SSRIs) incrementa el riesgo de hemorragia gastrointestinal. 2) a nivel cardiovascular: Eleva la presión arterial e interfiere con el efecto de disminuir la presión arterial de ciertos antihipertensivos tales como: los IECA y los diuréticos. Al combinarlo con los diuréticos incrementa riesgo de nefrotoxicidad. Puede producir alteración de los electrolitos especialmente hiperkalemia. Inhibe la agregación plaquetaria, produce falla cardiaca congestiva y 3) renal: produce insuficiencia renal [2].

5. *Arnica Montana*

5.1 Generalidades

De la familia asteraceae, tribu senecionae. Son cerca de 30 especies. Crece en el sur y parte oriental de Lituania. Es una planta que mide 60 cm, parecida a la margarita. Sus flores son amarillas, naranjas, brillantes. Crece en lugares húmedos, arenosos, suelos ácidos, con un drenaje adecuado, sobre todos en bosques de pinos, bosques mixtos, praderas. Se encuentra en riesgo de extinción por su alta recolección como materia prima para producir medicamentos [39].

Las flores de *Arnica montana* contienen Lactonas sesquiterpénicas (Helenalina y la 11 α , 13 -Dihidrohelenalina), su principal componente activo, flavonoides, aceites volátiles, terpenoides, otros componentes activos que hay son la inulina, taninos, carotenoides, polisacáridos [39].

Se ha utilizado por cientos de años como planta medicinal, debido a sus beneficios como: astringente, antibacteriana, antimicrobiana, antifúngica, antibiótica, antiinflamatoria y disminución del dolor, y para el manejo de lesiones y molestias musculares secundarias a prácticas deportivas, fracturas, hematomas [3, 39].

Se recomienda su uso externo no interno por riesgo de efectos secundarios. El tomar altas dosis de árnica produce efectos secundarios en Sistema digestivo: gastroenteritis; sistema cardiovascular: disnea y paro cardíaco. Uso externo, su uso prolongado produce, dermatitis de contacto, dermatitis edematosa, úlceras y necrosis [3, 39]. También si se toma *Arnica montana* puede causar dilatación vascular, estasis en la sangre e incrementar la permeabilidad capilar, al actuar en la pared de los vasos dañados y interrupción de la continuidad de la superficie esto permite el paso de elementos celulares del plasma al tejido. Esto explica la anticoagulación y daño de endotelio vascular explicando la causa de hemorragia por árnica. En el músculo produce dolor y rigidez similar a los efectos de acumulación del ácido láctico después de ejercicio físico excesivo. En el sistema nervioso central y periférico produce parálisis [40].

5.2 Mecanismo de acción molecular del *arnica montana*

Las flores de *Arnica montana* contienen las Lactonas sesquiterpénicas entre las que encontramos a la Helenalina, la cual se encuentra en el *Arnica montana* originaria de Lituania y la 11 α , 13- Dihidrohelenalina originaria de España, con ácidos grasos de cadena corta esterificados. Son Estas, el componente activo y su principal función es actuar como antiinflamatorias [3].

La Helenalina y la 11 α , 13- Dihidrohelenalina a bajas dosis: 5 ug/ml árnica española y 2 ug/ml tintura de *Arnica montana*. Inhiben la activación de la transcripción de los factores NF- $\kappa\beta$ y NF-AT, inhibiendo la unión del DNA al factor de transcripción [3].

En estudios realizados in vivo e *in vitro* donde observan la respuesta inmunológica del *Arnica montana*, encontraron que estimula la fagocitosis por macrófagos y la liberación de factor de necrosis tumoral por estos. En otro estudio hallaron que la Helenalina y la 11 α , 13- Dihidrohelenalina, inhiben la agregación plaquetaria a través de la interacción de las plaquetas con los grupos sulfhidrilo, asociado con la reducción de la fosfolipasa A₂ [40].

La Helenalina, principio activo del *Arnica montana* actúa en la vía de transcripción del NF- $\kappa\beta$ en dos sitios importantes, el primero en una pequeña proporción se une a la subunidad I $\kappa\beta$ inhibiéndola, y el segundo sitio de acción es el ataque directo a la subunidad p65 el cual no permite la unión del NF- $\kappa\beta$ al DNA, este se produce debido a que en el sitio de la cadena del DNA en el que se localiza la cisteína (localización 38) se adicionan grupos sulfhidrilo, llevándolo a la inhibición no solo del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$ sino a la inhibición de NF-AT[3].

Esta inhibición de los 2 factores de transcripción lleva a la no transcripción de genes de citoquinas, inhibiendo la producción de citoquinas como la IL-1 β y TNF α ; enzimas como la COX-2, iNO(óxido nítrico sintetasa), factores de crecimiento, hematopoyesis, proteínas de fase aguda [3].

El *Arnica montana* influye en la liberación de la IL-1 β y el TNF- α ambas se aumentan en la presencia de tejidos inflamados [3].

5.3 Farmacopea del *arnica montana*

“Se obtiene la planta en el estado verde, se mezcla el jugo recién extraído obtenido de la planta entera cuando se acerca su tiempo de floración con iguales partes del licor o espíritu del vino. Se obtiene 2 gotas del líquido claro, al permitir que repose la mezcla, primero se diluye con 98 gotas del licor o espíritu del vino y es potenciada por 2 succiones, la dilución se continua a través de 29 (veintinueve) frascos, siempre una gota de la más débil se agrega a 100 gotas de alcohol en el siguiente frasco y se sacude 2 veces, en el último frasco se lleva a desarrollo de la decillon potencia. Pero si no podemos obtener la planta en el estado verde se debe obtener la tintura hecha mediante la adición de 10 granos de la raíz en fino polvo, tan fresco como se pueda obtener, se agrega a 100 gotas de alcohol y lo que le permita digerir durante una semana se le da una sacudida por día, de esta se obtiene una gota y se agrega a 100 gotas de alcohol y potenciada por 2 succiones y así sucesivamente hasta que se alcanza la potencia decillon 2 o 3 de los glóbulos más pequeños se humedecen con las potencias más altas que son la mayoría de las dosis normales de uso interno”[41].

5.4 Materia médica del *arnica montana*

(Ver tabla 1).

6.Homeopatia

6.1Definición

Del griego homeos: lo que significa similar y patos: lo que significa sufrimiento[42].

La homeopatía surge hacia 1796 con Hahnemann como un movimiento de oposición al reduccionismo de la medicina europea de época, por esa misma época surge un nuevo movimiento literario el romanticismo, filosofía se ve al ser humano como centro del escenario se le da valor a sus sentimientos. Hahnemann estableció al individuo como eje de su enfoque al individualizarlo, busca individualizar criterios que expresen lo que es patognomónico de un individuo en particular, transformo la medicina en un arte de escuchar al individuo [4, 43].

La medicina homeopática se centra en el ser humano en continua interacción con el medio ambiente, el ser humano hace parte de un constante movimiento con el universo un movimiento que es la esencia de la vida misma infinito, dinámico. Los seres humanos son más que una simple manifestación de la naturaleza ya que son una unidad indisoluble compuesta por organismo material la energía vital o la fuerza y el espíritu donde ninguna de sus partes por si sola representa al ser humano ni puede manifestarse de forma independiente de la de otros. Hahnemann utilizó los términos de su época Lebenskraft (fuerza vital) y Lebensprincip (principio vital). Hahnemann postulo que la enfermedad no se encuentra en cualquier órgano o sistema sino que es un desarreglo del organismo como un todo, la enfermedad sería un nuevo orden fisiológico que por otro lado lleva la marca de la persona la terapéutica tendría como objetivo adaptar el individuo enfermo a este nuevo orden a través de los estímulos más similarmente a los estímulos más similar posible a los síntomas mental, físico, emocional que representan el sufrimiento de la persona como un todo[4].

El vitalismo fue el eje principal teórico para la construcción del sistema médico homeopático lo que hace operativa una clínica de los fenómenos vitales tanto en su dimensión experimentación como en la distinción entre una interpretación

mecanicista de los fenómenos clínicos y su interpretación en el contexto de las totalidades integrales que son los relatos de cada trayectoria individual[4].

Para Luz Madel Therezinha “ la homeopatía no es un vitalismo fisiológico afirmando la generación espontánea de la vida (y la enfermedad) sino un vitalismo destacando el equilibrio (y desequilibrio) de la fuerza vital de un individuo convirtiéndose en un sistema “racional” y “experimental del arte de la curación del enfermo” donde el conocimiento tiene como objetivo comprender y explicar el principio (ontológico) de los procesos de la enfermedad en los seres vivos , el origen (histórico) de la enfermedad (en vez de su causa) y los principales tipos de enfermedad (en vez de las principales enfermedades) de los seres humanos”[4].

Luz Madel Therezinha“explica la racionalidad médica desde el punto de vista epistemológico de Luwick Fleck acuño los conceptos de estilo de pensamiento y el pensamiento colectivo un estilo de pensamiento está en una instancia y al mismo tiempo orienta el pensamiento cognitivo, psicológico y sociólogo limita y restringe el pensamiento y las percepciones prácticas y teorías , las preguntas y las repuestas de los miembros de un colectivo que las comparten . los estilos de pensamientos son estructuras en ciclos concéntricos los especialistas esotéricos como los centros de producción innovación y el desarrollo de los conocimientos (científicos “punta” para la biomedicina) se trata de una referencia a la periferia de círculos internos (rondas intermedias, los médicos clínicos) que sirven como referencia y proporcionan servicios para los círculos exotéricos que son los laicos, pacientes , los servicios de salud usuarios de esta medicina”[43].

La medicina alternativa complementaria son sistemas diferentes y la atención medica de la salud, las prácticas médicas y productos presentes son considerados parte de la medicina convencional [44].

Según Luz Madel Therezinha se reconoce la homeopatía como un sistema médico complejo debido a que ve al ser de forma integral construida como un tipo ideal weberiano que define la racionalidad medica como un conjunto integrado y estructurado de las prácticas y conocimientos que se compone de 5 dimensiones entrelazadas tales como: : una morfología humana (anatomía, biomedicina), una dinámica vital (fisiología), un sistema diagnóstico, un sistema de doctrina médica y terapéutica (explica lo que es la enfermedad o enfermedades, su origen o causa, su desarrollo o curación) todos conectados en una sexta dimensión de forma explícita o implícita una cosmología, gracias a esta definición se puede distinguir entre un sistema medico complejo y biomédico [43, 44].

La racionalidad medica se usa en el contexto de atención médica especializada de clasificación de una acción interpretativa terapéutica preventiva

o curativa la más extensa y completa posible y al mismo tiempo las necesidades, la incorporación de muchas dimensiones de enfermedad y vida de los pacientes y la experiencia que guía al curador esto permite un cierto sentido de algunas reflexiones [43].

6.2 Principios y leyes de la homeopatía

6.2.1 Principio de la energía vital

Se basa en la teoría vitalista, se relaciona con la autocuración y la estrecha relación entre cuerpo y alma. Se centra en la energía del individuo. La enfermedad es el desequilibrio de la fuerza vital [42].

6.2.2 Ley de la semejanza

Cualquier sustancia que puede producir una totalidad de síntomas en un ser humano sano y puede curar esta totalidad de síntomas en un ser humano enfermo [7, 42].

6.2.3 Principio de la dosis mínima

Se basa en el uso de una baja dosis, la mayoría de remedios utilizados en homeopatía tienen una cantidad detectable de sustancia material tales como 1×10^{-3} o 1×10^{-6} , se encuentran sustancias altamente diluidas que superan el número de Avogadro (6.0623×10^{23}) con potencias como por ejemplo C12 las cuales tienen actividad biológica. Esto genera controversia la física actual no tiene respuesta [7, 42].

6.2.4 Ley de la individualidad

Se basa en que el ser humano es integral, indivisible y es diferente del resto de su especie [1].

6.2.5 Experimentación pura

Se basa en el método de investigación farmacológico por el cual se investigan y se descubren los efectos fisiológicos que caracterizan a los medicamentos que se experimentan en el hombre en aparente estado de salud. Los participantes son voluntarios sanos [1].

6.2.6 Acción y Reacción

Acción se refiere al efecto que produce el medicamento cuando se administra al individuo sobre su energía vital. La reacción se refiere a la respuesta que produce la energía vital del individuo [1].

6.2.7 Ley de la curación o del orden

Según Hahnemann se refiere a esta ley así: “En la terapéutica metódica y homeopática de una enfermedad crónica se observa, cuando no ha sido modificada o camuflada por tratamientos alopáticos, que los síntomas aparecidos últimamente, es decir, los más recientes, son también los primeros en desaparecer, mientras que los síntomas antiguos y los más tenaces, incluyendo sobre todo las afecciones locales persistentes, no desaparecerán hasta el final, después de la desaparición de las demás manifestaciones mórbidas y de que todo lo demás anuncie el retorno de la salud”[1].

6.2.8 El principio del remedio único

Esta norma la estableció Hahnemann según el cual en cada caso se debe administrar un único medicamento por enfermedad [1].

6.2.9 La teoría de los miasmas

No es una ley natural pero es un principio fundamental de la homeopatía se basa en que todo ser humano esta propenso a enfermar de cierta forma, hay una manera innata de enfermar (miasma) hay tres formas de hacerlo tales como: Psora, sycosis y syphilis. El miasma es una predisposición hereditaria que gracias a la ciencia moderna, inmunología y genética se puede corroborar tales como: noxas biológicas, ambientales, alimenticias, toxicas, traumáticas y factores mantenedores de la enfermedad tales como: circunstancias de la vida, el medio ambiente, el clima, la alimentación, el trabajo, la familia, la religión, la cultura, los hábitos, la actividad física. la filosofía y la religión como un medio para soportar mejor los sufrimientos [1, 5].

6.3 Potencia y su acción biológica

En homeopatía no hay una distinción frecuente en alta o baja potencia se basa en la presencia o no de molécula original y se basa en la constante de Avogadro. El

número de corte es de C12 o 24X/24D lo que equivale a 10^{-24} . Otro enfoque es la probabilidad de la respuesta fisiológica in vivo lo que resulta en un punto de corte de C9 o 18X/18D lo que equivale a 10^{-18} .

Hay varias hipótesis propuestas para explicar la acción biológica de las altas potencias entre estas: la teoría del entrelazamiento sobre la base de la teoría cuántica. La teoría de la información de hipótesis, la cual se trata de que el agua y otros solventes polares puedan determinar condiciones de almacenamiento de información específica sobre sustancias con las que han tenido previo contacto y posteriormente transmiten la información a biosistemas presetenciados. Las hipótesis relacionadas con la acción biológica con las bajas dosis están: la teoría de hormesis esta conecta sistemas convencionales, farmacológicos y toxicológicos. Este principio ofrece una vía para integrar el paradigma dosis respuesta en la farmacología convencional con el modelo dosis respuesta a la inversa del modelo dosis respuesta en homeopatía. La ley de Arndt—Schultz proporciona apoyo para vincular el principio de similitud a modelos biológicos y toxicológicos[45].

7. Diseño metodológico

7.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio *in vitro* transversal descriptivo.

7.2 Compuesto

Se adquirió *Arnica montana* de una fuente comercial (laboratorio Schmidtnagel), las diluciones se realizaron en NaCl al 0.9%. Las diluciones homeopáticas del trabajo fueron (6CH, 15CH, 30CH, 60CH, 200CH y 1000CH).

7.3 Obtención de las células mononucleares de sangre periférica

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de 2 individuos sanos mediante gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque por centrifugación a 400g por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI Invitrogen® a 300g por 10 min y la densidad celular se calculó por conteo en cámara de Neubauer, utilizando la siguiente fórmula:

Número de células = $X/4$ (fd) (V) (D)

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

fd = factor de dilución Azul Tripán/suspensión celular

V = 10.000 volumen de la cámara de Neubauer

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

7.3.1. Evaluación del efecto de *Arnica montana* sobre la viabilidad celular de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos

Para evaluar el efecto del compuesto *Arnica montana* sobre la viabilidad celular, las células mononucleares fueron utilizadas para los ensayos inmediatamente después de ser aisladas y se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂ en medio de cultivo celular RPMI suplementado con 10% de suero autólogo, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina/estreptomina.

La evaluación de la toxicidad de *Arnica montana* se realizó en cajas de cultivo de 96 pozos en los cuales se sembraron 1×10^5 células/pozo en un volumen total de 150µl de medio RPMI suplementado. Las células se sembraron por triplicado, para cada dilución y dosis de compuesto, y se utilizaron 6 pozos sin adición del compuesto “pozos control” para cada dilución y dosis. El tratamiento con *Arnica*

montana se llevó a cabo adicionando las dosis de (2, 4, 6, 8, 10 y 12µl), de las diluciones (6, 15, 30, 60, 200 y 1000 CH).

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

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

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

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

7.3.1.2 Evaluación de los niveles de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica *in vitro* tratadas con *Arnica montana*

Para determinar los niveles de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica tratadas con *Arnica montana* homeopatizada, se utilizaron 10 voluntarios sanos que cumplieron con los criterios de inclusión:

- Personas que no presentaran enfermedades virales, bacterianas, inmunosuprimidos y que estuvieran recibiendo algún tipo de tratamiento alopático u homeopático.
- Personas que tuvieran el número de células mononucleares necesarias para el estudio.
- Personas que autoricen el estudio firmando el consentimiento informado.

Se les tomo los signos vitales, y datos personales.

La cuantificación de los niveles de IFN γ se determinaron mediante ensayo de ELISA, utilizando el kit (IFN γ Human High sensitivity - Abcam n°46050) en los sobrenadantes de las células mononucleares cultivadas *in vitro* y tratadas con el compuesto homeopático en las diferentes diluciones (6, 15, 30, 60, 200 y 1000 CH). (Ver anexo B).

7.4 Ética

7.4.1 Aspectos éticos

En Colombia de acuerdo con la resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, en el Título 1 en lo referente a las investigaciones que se realicen en seres humanos, conforme lo menciona el artículo 8, en la presente propuesta se protegerá la privacidad de los participantes, identificándolos solo cuando los resultados lo requieran o éste los autorice, por esta razón durante el desarrollo de los diferentes procedimientos de laboratorio que involucren el manejo de muestras provenientes de los participantes y el manejo de datos, se llevará a cabo mediante el uso de un sistema codificado que permita proteger su identidad.

Según el artículo 11, las características de la presente propuesta corresponden a estudios de investigación con riesgo mínimo para los participantes. Será un requisito indispensable para el ingreso al estudio que cada padre o acudiente del paciente menor de edad diligencie completamente el formato de consentimiento informado, el cual será escrito en lenguaje claro, informando la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos a que se someterá, conforme lo establece el artículo 14 de dicha resolución. El investigador principal de esta propuesta suspenderá inmediatamente el estudio al advertir algún riesgo o daño para los participantes, se le informará al participante o en el caso de menores de edad, a sus padres o acudientes, acerca de su libertad de suspender o revocar su participación en la propuesta cuando así lo requieran.

7.4.1.2. Consideraciones éticas

Es la continuación de la fase I realizada por la Dra. Mónica Name, la cual ya fue evaluada y aprobada por el comité de ética de la Universidad Nacional con la resolución de mayo 28 de 2009 acta número 09.

Los voluntarios sanos que cumplieron con los criterios de inclusión firmaron el consentimiento informado (Ver anexo C).

7.5 Análisis estadístico

Se calculará el promedio y la desviación estándar (SEM) de los triplicados de absorbancia obtenidos de la lectura de citotoxicidad para cada dilución de *Arnica montana* utilizada. Posteriormente se calculará el porcentaje de viabilidad y los datos se analizarán utilizando el test de ANOVA con el programa estadístico SPSS 17,0. Se tiene en cuenta una ($p < 0,005$) estadísticamente significativa.

8. Resultados

Se realizó el estudio con 10 pacientes los cuales cumplieron con los criterios de inclusión.

8.1. Los valores unificados de los ensayos de la viabilidad celular del *Arnica montana* homeopatizada *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica

Se observa los siguientes hallazgos:

- Se determinó que la dosis letal C50 para *árnica* montana homeopatizada es mínima su toxicidad en las diluciones estudiadas.
- Hay viabilidad celular del 100 % en el control tanto a las 48 como 72 horas (figura 1 a y 1b).
- La viabilidad celular depende del tiempo, la dosis y la dilución utilizada (figura 1 a y 1b).
- Las diluciones 200 CH y 6 CH presenta la mayor viabilidad celular a las 48 horas con las mismas dosis 8 y 10 μ l (figura 1 a).
- La dilución 15 CH presenta mortalidad celular a las 48 horas con todas las dosis con una ($p < 0,05$) estadísticamente significativa (figura 1 a). Se observa algo interesante con esta dilución a las 72 horas la única dosis que muestra viabilidad celular es la de 12 μ l (figura 1 b).

- La dilución 1000 CH a las 72 horas muestra el mayor porcentaje de viabilidad celular con respecto a las otras diluciones, con un porcentaje del 160 % y una ($p < 0,005$) estadísticamente más significativa (figura 1b).
- La dilución 6 CH a las 72 horas muestra mortalidad celular con una ($p < 0,0001$) estadísticamente significativa contrario a lo que se observó a las 48 horas (figura 1b).
- La dilución 200 CH es la segunda dilución con mayor porcentaje de viabilidad celular a las 72 horas con la dosis de 10 μ l (figura 1b).
- La dilución 30 CH muestra viabilidad celular a las 48 y 72 horas es diferente con cada dosis, su mortalidad celular varía entre el 2 y 10% a las 48 horas (figura 1 a) y disminuye su mortalidad entre el 2 y 5% a las 72 horas (figura 1b).
- La dilución 60 CH muestra viabilidad celular a las 48 y 72 horas es diferente con cada dosis, su mortalidad celular es del 5% a las 48 horas (figura 1 a) y aumenta del 5 al 10 % a las 72 horas (figura 1 b).
- La dosis de 4 μ l a las 72 horas es la que mejor viabilidad celular presenta con todas las diluciones (figura 1b).

8.2 Efecto *in vitro* de *Arnica montana* homeopatizada sobre los niveles de IFNY en células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos

En general se observa una respuesta de forma individual de cada paciente con la producción del IFNY a pesar de que se manejó la misma dosis 4 μ l de *Arnica montana* con las mismas diluciones (6 CH, 15 CH, 30 CH, 200CH, 1000 CH) cultivadas durante 72 horas (figura 2 a y 2b).

Se observa los siguientes hallazgos:

- Las células mononucleares de los controles (células mononucleares sin tratamiento de *árnica*) no produjeron IFNY (figura 2b).

- Las células mononucleares tratadas con *Arnica montana* de 2 voluntarios sanos p3 y p4 no produjeron IFNY ni los controles ni ninguna de las diluciones a los cuales se expusieron sus células mononucleares (figura 2a).
- Las células mononucleares tratadas con *Arnica montana* produjeron IFNY con la dilución 1000 CH la cual tiene la mayor viabilidad celular a las 72 horas en todos los voluntarios sanos, cada uno con diferentes valores (figura 2 a y 2 b).
- Las células mononucleares tratadas con *Arnica montana* produjeron IFNY con la dilución 200 CH la cual es la segunda en viabilidad celular a las 72 horas en todos los voluntarios sanos cada uno con diferentes valores (figura 2a y 2b).
- Las células mononucleares tratadas con *Arnica montana* produjeron IFNY con la dilución más baja 6 CH la cual tuvo la mayor mortalidad celular a las 72 horas en todos los voluntarios, cada uno con diferentes valores, siendo mayor su producción de IFNY comparado con las otras diluciones en los voluntarios sanos p5 y p7 (figura 2a y 2b).
- Las células mononucleares tratadas con *Arnica montana* produjeron IFNY con la dilución 15 CH a las 72 horas a pesar de la mortalidad celular cada uno con diferentes valores (figura 2a y 2b).
- Las células mononucleares tratadas con *Arnica montana* produjeron IFNY con la dilución 30 CH a las 72 horas cada uno con diferentes valores (figura 2a y 2b).
- Las células mononucleares tratadas con *Arnica montana* produjeron Se observa producción de IFNY con la dilución 60 CH a las 72 horas cada uno con diferentes valores se observa en el p10 que es la mayor con respecto a las otras diluciones (figura 2a y 2b).
- Las células mononucleares tratadas con *Arnica montana* produjeron IFNY con las diluciones 30 CH comparada con la 60 CH presentan un

estímulo de crecimiento similar en el p1 y p7 (figura 2a y 2b) , se observa que cada barra muestra un porcentaje de producción diferente pero una imagen repetitiva entre estas dos diluciones la dilución 30 CH se disminuye mientras la dilución 60 CH se aumenta (figura 2a y 2b).

9. Discusión y Conclusiones

- En el estudio *in vitro* realizado se observó que el *Arnica montana* homeopatizada favoreció la proliferación de las células mononucleares. Además estimula la producción del IFN γ evidenciando que si es una potente citoquina pro inflamatoria y que favorece la producción de células mononucleares [13]
- El *Arnica montana* por medio de varios procesos biológicos entre ellos la activación de las vías de señalización y segundos mensajeros inhibiendo activación de la transcripción de los factores NF- κ B y NF-AT, inhibiendo la unión del DNA al factor de transcripción [3]. El factor NF-AT transcribe en el núcleo el gen del IFN γ y este a su vez contiene en el núcleo un sitio potencialmente funcional en NF- κ B [14, 23, 25].
- En el estudio realizado *in vitro* de *Arnica montana* homeopatizada con las diferentes diluciones se observó que es capaz de generar toda el proceso biológico, con activación de todas las vías de señalización y activación de los factores de transcripción permitiendo la proliferación de las células mononucleares y producción de citoquinas en este caso la que se midió fue el IFN γ pero si se hubiera medido otras también nos daría una respuesta de producción de citoquinas. En los estudios realizados como se nombran en el anterior párrafo refieren que el *Arnica* inhibe la transcripción de los factores NF- κ B y NF-AT, pero en este estudio nos reporta algo diferente.
- Se observa algo interesante en este estudio *in vitro* de *Arnica montana* homeopatizada las células mononucleares de los controles (células mononucleares sin tratamiento de *Arnica*), presentan una respuesta completamente diferente estas células no producen IFN γ , pero si hay proliferación de células mononucleares (figura 2b).
- Entre más horas estuvieron expuestas las células mononucleares al *Arnica montana* la viabilidad celular fue más alta como se observó con la dilución 1000 CH a las 72 horas (figura 1b), y viceversa entre menos

horas se deje expuesta el *Árnicamontana* como se observó con la dilución 6 CH a las 48 horas. (figura 1a).

- Las diluciones que superan el número de Avogadro para nuestro caso desde la 15 CH[7]. Muestran proliferación celular y producción del IFNY (figura 1b).
- Se observa una contradicción muy interesante en la dilución 15 CH donde ya se superó el número de Avogadro vemos como tanto a las 48 y 72 horas hay mortalidad celular con una ($p < 0,05$) estadísticamente significativa, solo hay proliferación celular con la dosis de *Arnica montana* de 12 μ l, pero si hay producción de IFNY (figura 1a y 1b).
- La respuesta de proliferación celular a las 48 horas es muy diferente se observa como una dilución baja 6CH tiene una alta proliferación celular similar con una dilución alta 200 CH. Esto nos podría conducir a que se puede utilizar cualquiera de las 2 diluciones para un tratamiento con *Arnica montana* homeopatizada en un manejo menor a 48 horas.
- Los pacientes tiene respuestas individualizadas a las diferentes diluciones ya sean altas o bajas, depende de cada paciente, algunos responden primero a altas diluciones que a diluciones bajas. Se propone que no debería ser regla que las altas dosis son para lo mental y las bajas dosis para lo físico en el manejo del tratamiento homeopático[45].
- La proliferación celular depende de la dosis del medicamento que se utilice, la dilución utilizada y el tiempo de exposición de esta al medicamento a 48 horas hay mayor mortalidad celular que a 72 horas, esto lo observamos con la dosis de 8 μ l (figura 1 a y 1b).
- El medicamento homeopático actúa según el terreno de cada individuo. Nuevos estudios demuestran que el medicamento tiene una acción ligada al efecto neuroendocrino y sistema inmune dependiendo sobre la afinidad toxicológica, bioquímica y farmacológica de la sustancia administrada[4].
- El *Arnica montana in vitro* homeopatizada si genera proliferación celular de forma individualizada en cada paciente cumpliendo con los principios de la homeopatía[1].

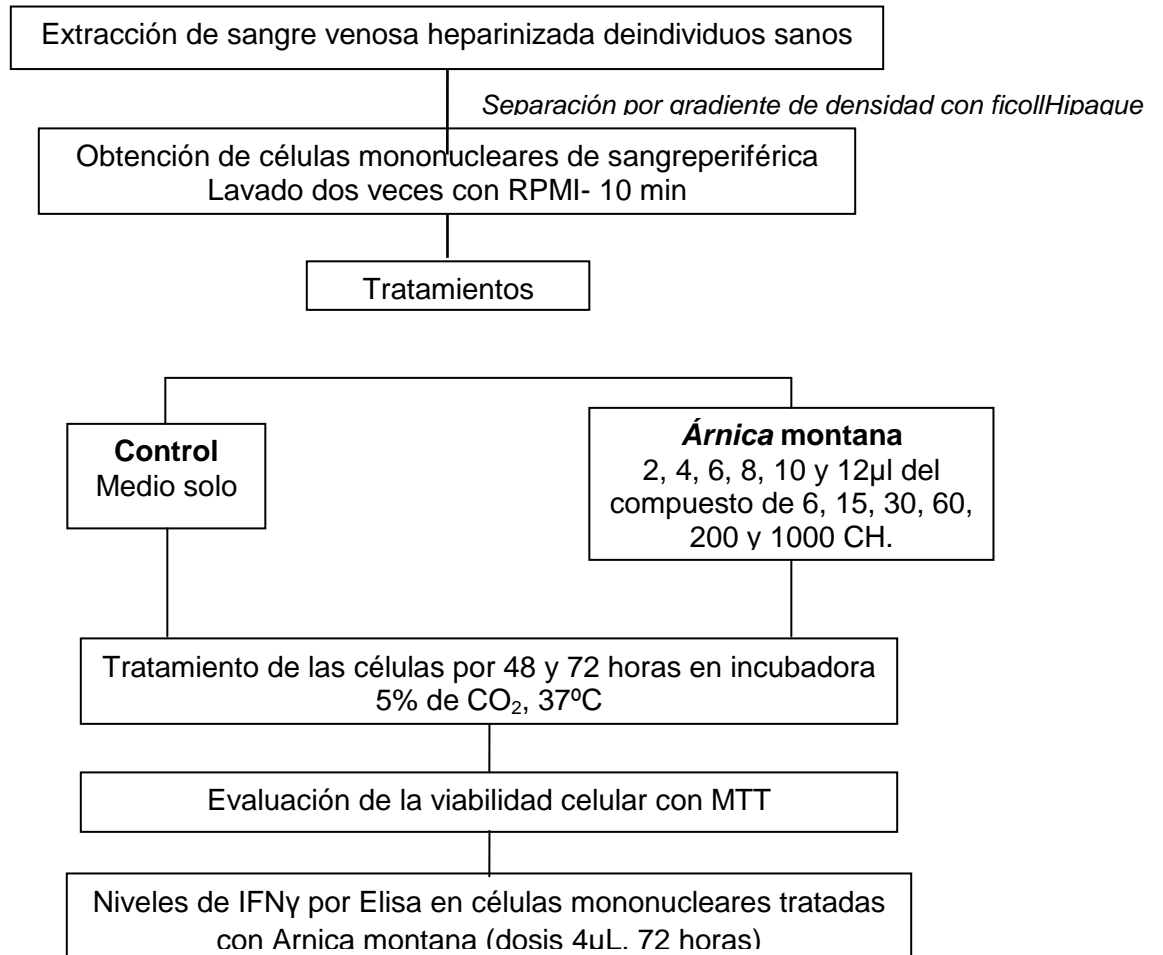
- Los AINES en los estudios realizados se evidencia que su mecanismo de acción consiste en que son inhibidores no selectivos de ambas isoenzimas ciclooxygenasas COX-1 y COX-2 de esta manera previenen la formación de todas las prostaglandinas cuya función es producir, dolor, inflamación y fiebre[38].
- Se sugiere que los mecanismos epigenéticos de cada individuo podrían contribuir a la explicación de porqué se observa una respuesta individual a pesar que a todas las células mononucleares obtenidas de sangre periférica de los voluntarios sanos se les agregó la misma cantidad de *Arnica montana* 4 µl y se sembró el mismo número de células mononucleares por 72 horas, evidenciándose una producción diferente las células mononucleares en la producción de IFN γ [37].
- Además observamos un fenómeno físico que no es claro aún y que dentro de algunos años nos ayudara a entender porque hay crecimiento celular y proliferación de las citoquinas en nuestro caso el IFN γ a altas diluciones cuando ya superamos el número de Avogadro y no hay moléculas de átomos pero si hay otros componentes.

9.1. RECOMENDACIONES

Se recomienda lo siguiente:

- Realizar estudios de *Arnica montana* con otras citoquinas como por ejemplo la IL-10 la cual es una citoquina antiinflamatoria.
- Ejecutar estudios *in vitro* de *Arnica montana* homeopatizada para demostrar su efecto inmunomodulador en células mononucleares de pacientes con trauma a diferentes diluciones (6CH, 15CH, 30CH, 60CH, 200CH y 1000CH) sobre varias citoquinas como IFN- γ , IL-6, IL-2, IL-10.
- Para próximos estudios realizar una historia clínica homeopática a los voluntarios sanos repertorizarlos y con su medicamento constitucional ver cuántos son *Arnica montana* y cuantos no, compararlos con el otro medicamento y realizar un análisis completo.

A. Anexo : *Procedimiento para obtener células mononucleares y cultivo celular*



B. ANEXO. Procedimiento para obtener elisa del ifny elisa por metodo Elisa

PASOS PARA LA DETECCION DE MOLECULAS ESPECÍFICAS

Adiciona 100 µl de muestra o dilución estándar
Incubar 1 hora en un cuarto a temperatura con baja revolución
Lavar 3 veces
Adicionar 50 µl de dilución de biotinato de anticuerpos en todos los platos
Incubar 1 hora en un cuarto a temperatura con baja revolución
Lavar 3 veces

PASOS DE AMPLIFICACION STREPTAVIDINA-HRP

Adicionar 100 µl de streptavidina-HRP (solución 1) a todos los platos
Incubar 20 minutos en un cuarto a temperatura con baja revolución
Lavar 3 veces
Adicionar 100 µl de amplificar todos los platos
Incubar 15 minutos en un cuarto a temperatura con baja revolución
Lavar 3 veces
Adicionar 100 µl de streptavidina-HRP (solución 2) a todos los platos
Incubar 20 minutos en un cuarto a temperatura con baja revolución
Lavar 3 veces

Grafico tomado de HUMAN HIGH SENSITIVITY IFNY ELISA Kit (instructivo del laboratorio Abcam)

PASOS DE REVELACION Y LECTURA

Adicionar 100 µl de TMB se usa para lectura.
Protegerlo de la luz. Lleva al desarrollo del color alrededor de 5 minutos.
Adicionar 100 µl H₂SO₄
Leer la absorbancia a 450 nm

Grafico tomado de HUMAN HIGH SENSITIVITY IFNY ELISA Kit (instructivo del laboratorio Abcam)

C. ANEXO. *Consentimiento informado*

Fecha dd ____ mm ____ aa ____

Fase II: Efecto de *Arnica 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 *Arnica 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: . dolor mínimo mientras se realiza la punción y algunos minutos después; aparición de moretón en el sitio de punción, que desaparecerá en pocos días sin necesidad de tratamiento; es probable que se necesite puncionar más de una vez , si no se obtiene 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 _____

FIGURA 1.A

Efecto *in vitro* de *Árnica montana* homeopatizada en células mononucleares de sangre periférica 48 horas

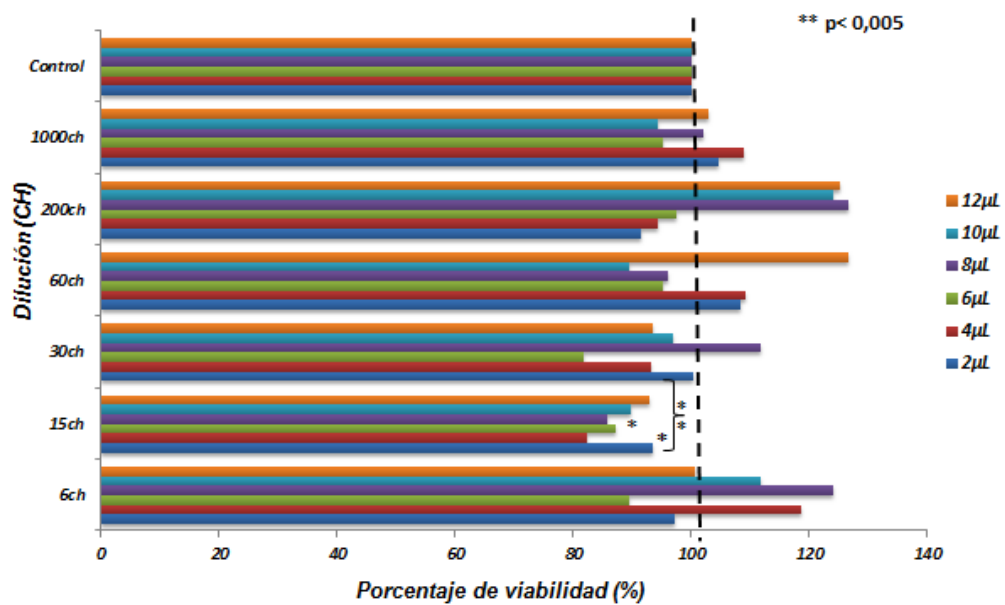


FIGURA 1.B.

Efecto *in vitro* de *Árnica montana* homeopatizada en células mononucleares de sangre periférica a las 72 horas

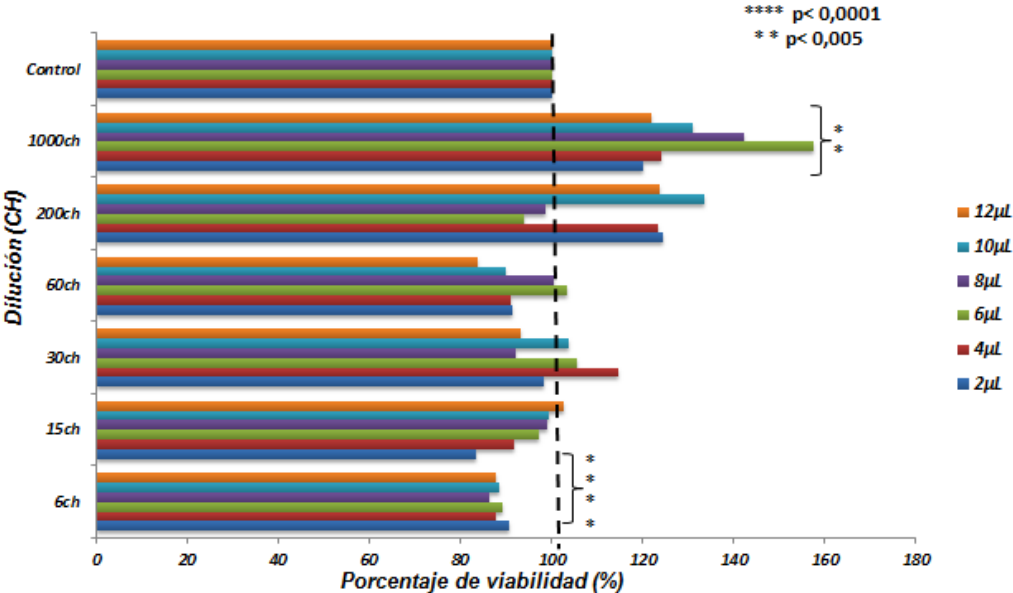


FIGURA 2.A

Efecto *in vitro* de *Árnica montana* homeopatizada sobre los niveles de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos del 1 al 5

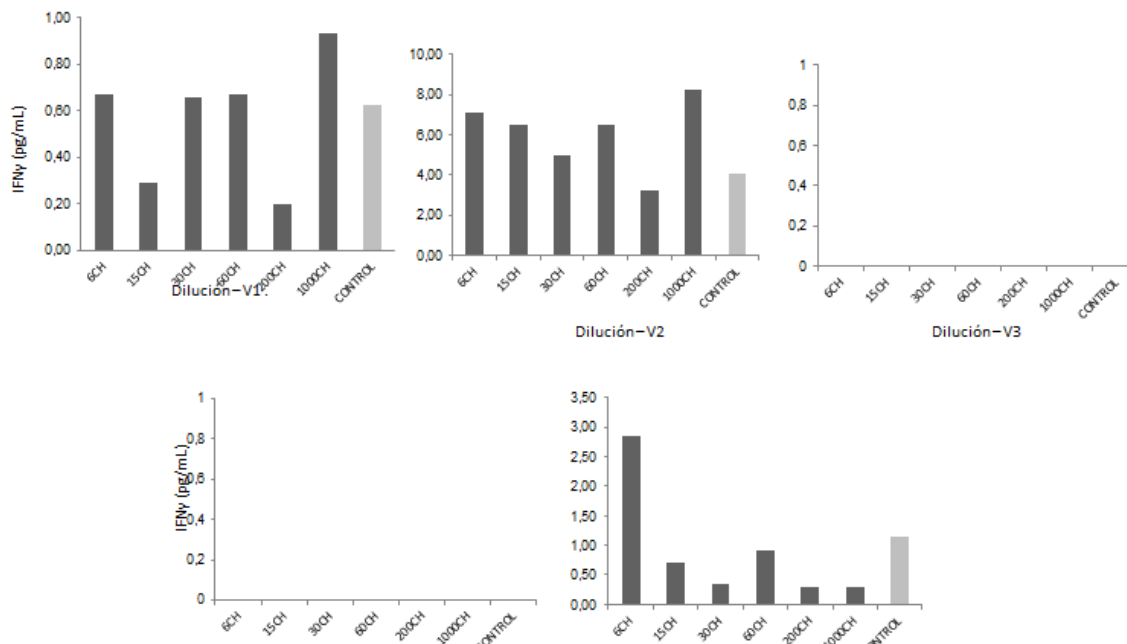


FIGURA 2.B

Efecto *in vitro* de *Árnica montana* homeopatizada sobre los niveles de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos del 6 al 10

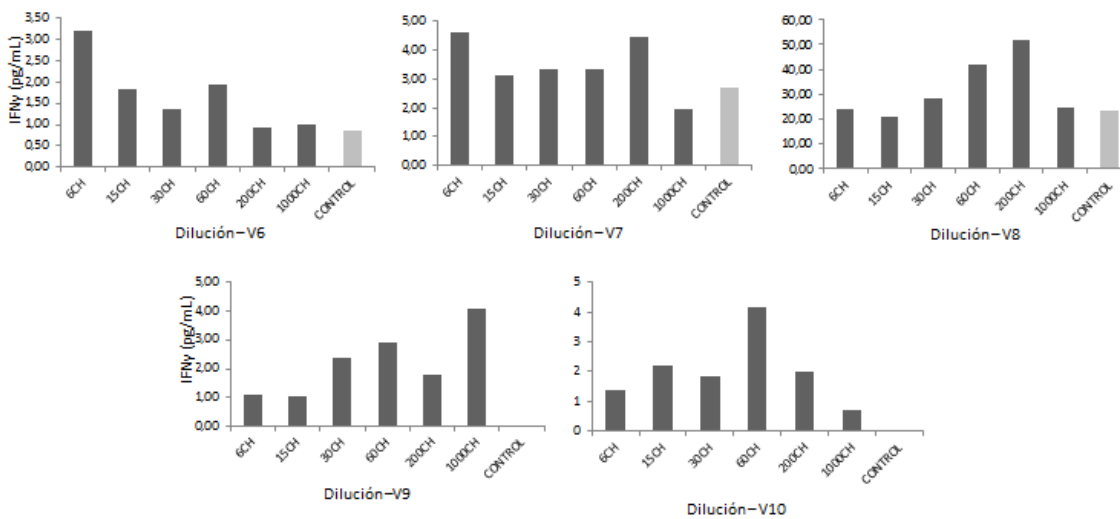


TABLA 1

ORIGEN	FAMILIA	Planta vivaz de la familia de las compuestas (Asteráceas) que brota sobre ltodo los pastos de las montañas [46].
	COMPOSICION TINTURA MADRE	Es compleja se prepara de la planta entera fresca contiene. Flavonoides : estos tienen tropismo venoso y cardiotónico tales como vasodilatador coronario y antihipertensivos. Pigmentos carotenoides y manganeso los cuales tienen un efecto antineurálgico, antirreumático, antiinflamatorio y antiequimótico). Fenoles tales como ácidos cafeico y clorogénico que tienen efectos cardiotónicos, antibióticos y fungicidas). lactonas la principal la helenalina conocida por su acción irritante sobre la piel y su acción antiinflamatoria [46].
ACCION GENERAL	MUSCULOS Y TEJIDO CELULAR	Actúa sobre la fibra muscular, determina trastornos circulatorios en arterias y capilares esto explica su acción sobre vísceras tales como :cerebro y bulbo [47].
	VASOS SANGUINEOS	Actúa sobre los vasos sanguíneos especialmente sobre los capilares facilita la extravasación sanguínea y produce síntomas similares a la contusión o traumatismo [47].
TIPOLOGIA		Individuo pletórico, de cara roja ,ojos inyectados, labios secos, hinchados, agrietados, hipersensibles [47].
SIGNOS CARACTERISTICOS	SENSACIONES	Contusión, sensación de agujetas por todo el cuerpo, dolores musculares, sensación de como si estuviera magullado, dolores como si lo hubieran golpeado, debilidad, lasitud, siente como si la cama fuera demasiado dura [47].
MODALIDADES	MEJORA	El movimiento, acostado con la cabeza baja[47].
	AGRAVA	El frio húmedo, el mínimo tacto (teme ser tocado), el vino y el reposo [47].
	LATERALIDAD	izquierda superior y derecha inferior [47].
SINTOMAS MENTALES		Extrema debilidad, se postra, triste, desea estar tranquilo, que no le hablen, que no se le arrimen, indiferente, ansioso, hipocondriaco en los momentos de mayor aprehensión se espanta o se imagina toda clase de cosas angustiantes si sufre del corazón o tiene una perturbación orgánica profunda(Kent) [47].
SUEÑO		Somnolencia durante el día y en la noche sueño agitado, pesadillas, sueños penosos, se despierta brusca y frecuentemente lleva las manos al pecho, oprime la región cardíaca, parece aterrorizado, le despierta el temor a la muerte[47]
MANIFESTACIONES CLINICAS		
CABEZA		Cabeza caliente, resto cuerpo frio, cefalea supra orbitaria, vértigo, apoplejía[47].

APARATO DIGESTIVO	BOCA	Aliento fétido, olor bucal pútrido, eructo con olor a huevo podrido, boca seca con sed, lengua cubierta por capa blanca[47]
	ESTOMAGO	No tiene apetito, durante la comida sufre del estomago, después de comer sensación de plenitud, sensación de peso en el estomago siente como una piedra, siente que estomago esta oprimido contra la columna vertebral. Aversión: leche y carne. Deseo de vinagre [47].
	INTESTINOS	Vientre inflado, calmado, emisión de gas a huevo podrido [47].
	DEPOSICION	Ofensiva ,irritante, sanguinolenta, involuntaria a veces de noche durante el sueño[47].
APARATO URINARIO		No consigue orinar después de un esfuerzo violento. Retención espasmódica con presión vesical, tenesmo, orina roja, oscura, color ladrillo [47].
	FEMENINOS	Síntomas marcados en la mujer. Sensación de magulladura en región uterina que impide caminar derecha, sensibilidad dolorosa abdominal, principalmente pelviana. En la embarazada los movimientos del feto son dolorosos, la despiertan en la noche. La sensación de magulladura se extiende a recto y labios que se encuentran hinchados y dolorosos. Varices en vulva y vagina. Reglas adelantadas. Entre regla puede haber pérdida de sangre. dolor en vías genitales después del parto [47].
APARATO RESPIRATORIO	LARINGE	Afonía después de hablar mucho. Siente como si la mucosa laríngea estuviera en carne viva por la mañana. Tos producida por exceso de gritos y llanto [47].
	BRONQUIOS Y PULMONES	tos paroxística nocturna, hemoptisis después de un traumatismos o esfuerzos violentos respiratorios y circulatorios [47].
APARATO CIRCULATORIO		Sufre del corazón puede sentir puntos dolorosos en región precordial o sensación magulladura acompañada de fatiga intensa y gran debilidad. Arnica sangra mucho [47].
TRAUMATISMOS		Principal medicamento para contusiones para traumas, golpes, heridas. Cuidados pre y postquirúrgicos, después del parto en céfalo hematomas del recién nacido, hemorragias escasas o abundantes[46].
EXTREMIDADES Y ESPALDA		Dolor de espalda como magulladura, rigidez en los miembros con sensación de magulladura como si la hubiesen golpeado. Dolor por exceso de ejercicio físico ,señala sensación dolorosa en dedo gordo del pie, con tumefacción brillante roja y caliente, hipersensible al menor contacto, dolor intolerable similar a la gota(Kent) [47].
PIEL		Granos forunculosos, acné doloroso, distribución simétrica, erupción de pequeñas vesículas sobre base eritematosa con calor y prurito. Tendencia a equimosis al menor contacto [47].
FIEBRE		Cabeza roja y caliente resto del cuerpo frio especialmente al atardecer y en la noche, en la noche transpiración agria y acida, sensación de que el cuerpo es regado con agua fría. Estado febril adinámico, escalofríos e intensa sed [46, 47]

Bibliografía

- Fabio Gonzalez, L.F.V., Javier Diaz del Castillo, *Doctrina Homeopatica*, in *Doctrina Homeopatica*, F.I.C.d.H.L.G. Paez., Editor. 2005: Bogotá p. 12,203,234.
2. Ward, R., *Identifying and assessing benefit risk in primary Rheumatology* 2010. **49**: p. 18–23.
 3. Merfort, I., *Arnika: Neue Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus einer traditionellen Heilpflanze*. Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd, 2003. **suppl1**: p. 45–48
 4. Poitevin, B., *Mechanism of action of homoeopathic medicines Recent findings and hypotheses 1" Biological mechanisms*. British Homoeopathic Journal, April 1995. **84**: p. 102-107.
 5. Adler, U.C., *Low-grade inflammation in chronic diseases: An integrative pathophysiology anticipated by homeopathy?* Medical Hypotheses 2010 24 December. **76**(2011): p. 622–626.
 6. Montfort-Cabello, H., *Education and Debate Chronic diseases:what are they? How are they inherited?* Homeopathy 2004. **93**: p. 88–93.
 7. C Stevinson V, S.D.F., *Homeopathic arnica for prevention of pain and bruising: randomized placebo-controlled trial in hand surgery*. J ournal of the Royal Society of Medicine. , 2 0 0 3 F e b r u a r y. **9 6**: p. 60-65.
 8. Albrecht, R.V.W.y.H., *Proving and therapeutic experiments in the HomBRex basic homeopathy research database*. homeopathy, 2007. **96**(96): p. 252-257.
 9. Claudia M. Witta, M.B., Henning Albrecht, Thorolf E.R. Weißhuhna, Stephan Baumgartner, Stefan N. Willich, *The in vitro evidence for an effect of high homeopathic potencies—A systematic review of the literature*. Complementary Therapies in Medicine, 2007. **15**: p. 128—138.
 10. Jens-hagen karow, H.-p.a., Markus fröhling, y Hanns ackermann., *Efficacy of Arnica montana D4 for Healing of Wounds After Hallux Valgus Surgery Compared to Diclofenac*. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2008. **14**(1): p. 17–25.
 11. Anita Conforti, P.B., Simone Bertani, Flavia Chiarotti., *Rat models of acute inflammation: a randomized controlled study on the effects of homeopathic remedies*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2007. **7**:1.
 12. Medzhitov, R., *Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame*. Cell, 2010, marzo. **140**: p. 771-776.
 13. Kevin R Kasten, H.S.G., Maria R Reid, Alison M Rasper, Samuel G Adediran, Chad T Robinson, Cindy M Cave, Joseph S Solomkin, Alex B Lentsch, Jay A Johannigman, Charles C Caldwell*, *Divergent adaptive and innate immunological responses are observed in humans following blunt trauma*. BMC Immunology, 2010,. **11**:4(4): p. 1-9.

14. Junping Xina, b., Derek A. Wainwrighta,b, et al. , *Phenotype of CD4+ T cell subsets that develop following mouse facial nerve axotomy*. Brain Behav Immun., 2008 May **22**(4): p. 528–537.
15. Patrick Blanco , A.K.P., Virginia Pascual , Jacques Banchereau., *Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases*. Cytokine & Growth Factor Reviews 2008. **19**: p. 41–52.
16. Kerstin Steinbrink , K.M., Stephan Grabbe , Alexander H. Enk , Helmut Jonuleit *Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance?* Human Immunology 2009. **70**: p. 289-293.
17. Heung Kyu Lee, A.I., *Innate control of adaptive immunity: Dendritic cells and beyond*. Seminars in Immunology 2007. **19**: p. 48–55.
18. Angelo Sala, G.F., Robert C. Murphy., *Transcellular biosynthesis of eicosanoids*. pharmacological Reports, 2010. **62**: p. 503-510.
19. Yolanda Alvarez, I.V., CristinaMunicio,Etzel Hugo, Francisco Padr´ on, Lydia Blanco, Mario Rodr´iguez, Nieves Fern´andez, andMariano S´anchez Crespo, *Eicosanoids in the Innate Immune Response: TLR and Non-TLR Routes*. Mediators of Inflammation, 2010. **Volume 2010**.
20. Wen-Hsiang Su, M.-H.C., Wen-Ling Lee, Tsung-Shan Tsou,Wen-Hsun Chang, Chien-Sheng Chen, and Peng-HuiWang, *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs forWounds:Pain Relief or Excessive Scar Formation?* Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation, 2010, Junio 2 **2010**.
21. Auemduan Prawan, C.L.L.S., Tin Oo Khor, Young-Sam Keum, Siwang Yu, Longqin Hu, and Ah-Ng Kong, *Anti-NF- κ B and Anti-inflammatory Activities of Synthetic Isothiocyanates: effect of chemical structures and cellular signaling* Chem Biol Interact. . Chem Biol Interact. , 2009 May. **179**((2-3)): p. 202–211
22. Peter RuÈ ngeler, V.C., Gerardo Mora, Nezhun GoÈ ren,Walter Vichnewski, Heike L. Pahl, Irmgard Merfort ,and Thomas J. Schmidt f., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Inhibition of Transcription Factor NF-B by Sesquiterpene Lactones: a Proposed Molecular Mechanism of Actiony, 1999. **7**: p. 2343-352
23. Mark S Sundrud, M.A.N., et al., *Synergistic and combinatorial control of T cell activation and differentiation by transcription factors*. Current Opinion in Immunology 2010. **22**: p. 286–292.
24. Antonio Vega, P.C., Javier Monteseirín, Rajaa El Bekay, Gonzalo Alba, José Martín-Nieto y Francisco Sobrino, *Expression of the transcription factor NFAT2 in human neutrophils: IgE-dependent, Ca²⁺- and calcineurinmediated NFAT2 activation*. Journal of Cell Science, 2007. **120**: p. 2328-2337.
25. Mahesh Yadav, L.C., and Jeffrey S. Schorey, *Macrophage's Proinflammatory Response to a Mycobacterial Infection Is Dependent on Sphingosine Kinase-Mediated Activation of Phosphatidylinositol Phospholipase C, Protein Kinase C, ERK1/2, and Phosphatidylinositol 3-Kinase1*. The Journal of Immunology., 2006. **176**: p. 5494–5503.
26. Hong Jiang , L.C., *Mechanisms of Disease Regulation of Immune Responses by T Cells*. The new england journal o f medicine, 2006. **354**: p. 1166-1176

27. Z Zidek, P.A.a.E.K.k., *Current status and challenges of cytokine pharmacology*. British Journal of Pharmacology 2009. **157**,: p. 342–361.
28. Sabrina Mariotti, V.S., Cinzia Marcantonio, Emiliano Todero, Raffaella Teloni, Maria Cristina Gagliardi, Anna Rita Ciccaglione, and Roberto Nisini¹, *T-cell-mediated and antigen-dependent differentiation of human monocyte into different dendritic cell subsets: a feedback control of Th1/Th2 responses*. The FASEB Journal, September 2008. **Vol. 22**
29. Malcolm P. MacConmara, M., BCh, Adrian A. Maung, , Satoshi Fujimi, MD, Ann M. McKenna, , Adam Delisle, BS, Peter H. Lapchak, Selwyn Rogers, and a.J.A.M. James A. Lederer, *Increased CD4 CD25 T Regulatory Cell Activity in Trauma Patients Depresses Protective Th1 Immunity*. Annals of Surgery, October 2006. **Vol, 244**(4).
30. Claire N. Stevens, A.-M.S., Susan John. et al., *T-cell receptor early signalling complex activation in response to interferon- α receptor stimulation*. Biochemical Journal. , 2010: p. 428-437.
31. Thomas M. Aune, A.L.M., Somee Kim, Mark Boothby, y Andrew H. Lichtman, *Costimulation Reverses the Defect in IL-2 But Not Effector Cytokine Production by T Cells with Impaired I κ B α Degradation*¹. The Journal of Immunology, 1999. **162**: p. 5805-5812

32. Claudia Jude , D.D., *Noi Citokine poinflamatoare ca ținte terapeutice în artrita reumatoidă*. Clinica Medicală III, Cluj-Napoca, 2009. **Vol. LXXXII** (339): p. 342.
33. Kumiko Tanabe, R.M.-N., Shinobu Yamaguchi, Hiroki Iida, Shuji Dohi, Osamu Kozawa, *Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells* *Journal of Neuroinflammation* 2010, 7:16. *Journal of Neuroinflammation* 2010., 2010.**7:16**
p. 2-8.
34. Ling Zeng, W.G., Kehong Chen, Dongpo Jiang, Lianyang Zhang, Dingyuan Du, Ping Hu, Qing Liu, Suna Huang y Jianxin Jiang, *Clinical relevance of the interleukin 10 promoter polymorphisms in Chinese Han patients with major trauma: genetic association studies*. Critical Care 2009. **13**(6 R:188): p. 1-8.
35. Myung-Gyu Kim, H.N.Y., Hye-Won Kim, Sang-Kyung Jo, Won Yong Cho, and Hyoung-Kyu Kim, *IL-10 Mediates Rosiglitazone-Induced Kidney Protection in Cisplatin Nephrotoxicity*. J Korean Med Sci, 2010. **25**: p. 557-63.
36. Jose Francisco Garcia-Lazaro , F.T., Stefan Luth a, Piotr Czochra, Erik Meyer, Isaias Balderas Renteria , Peter R. Galle , Ansgar W. Lohse , Johannes Herkel , Stephan Kanzler *Hepatic over-expression of TGF- β 1 promotes LPS-induced inflammatory cytokine secretion by liver cells and endotoxemic shock*. Immunology letters . Elsevier, 2005. **101**: p. 217–222

37. Gary Deng, W.W., Amit Sood, and Kathi J. Kemper., *Research on Integrative Healthcare: Context and priorities*. Explore, 2010. **6**: p. 143-158.
38. Sven-Christian Pawelzik, N.R.U., Linda Spahiu, Caroline Jegerschöld, Patric Stenberg, Hans Hebert, Ralf Morgenstern, Per-Johan Jakobsson, *Identification of key residues determining species differences in inhibitor binding of microsomal*

- prostaglandin e synthase-1*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2010, July p. 1-17.
39. Asta Judžentienė, J.B., *Analysis of the chemical composition of flower essential oils from Arnica montana of Lithuanian origin*. chemija., . 2009. . **vol. 20.**(No. 3): p. 190–194
40. SB Macedo, L.F., FF Perazzo, JC Tavares Carvalho, *Anti-inflammatory activity of Arnica montana 6cH: preclinical study in animals*. Homeopathy 2004. **93**: p. 84–87.