



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

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

Juan Camilo Rojas Quintero

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Medicina Alternativa - Homeopatía

Bogotá, Colombia

2011

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

Juan Camilo Rojas Quintero

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Medicina Alternativa – Area Homeopatía

Director:

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

EXPLORACIÓN DEL EFECTO DE ALTAS DILUCIONES SUCUSIONADAS
(MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO) DE *Phytolacca americana* – Fase III

Facultad de Medicina
Maestría en Medicina Alternativa - Homeopatía
Bogotá, Colombia

2011

*A todos aquellos que con su colaboración,
acompañamiento, paciencia y amor, hicieron
posible este sueño...*

Agradecimientos

A mi Madre, por su apoyo incondicional, por su esfuerzo, por su tenacidad, por su bondad, por que ha sido mi inspiración y por que ha sido un motor en todo este proceso.

A mis amigos y compañeros de Maestría, por que encontré en cada uno de ellos, un apoyo, una conversación, una fuente de enriquecimiento personal

A mi director de trabajo de grado, Dr. Caminos, por su acompañamiento y esfuerzo en la realización de todos estos experimentos que enriquecen la investigación en Homeopatía.

Resumen

Phytolacca americana es una planta que preparada bajo el método homeopático se ha usado para el manejo de enfermedades que cursan con adenopatías, sabemos que in Vitro exhibe un efecto sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica, principalmente linfocitos y sobre la producción de diversas citoquinas. El objetivo de este trabajo fue la exploración del efecto de *Phytolacca americana* sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica y sobre la producción de TNF α , en diluciones consecutivas entre la 12 CH y la 18 CH. Para la evaluación de la viabilidad celular se usó el método MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) y para la cuantificación de la producción de TNF α el método ELISA, se analizaron muestras de sangre periférica de 10 individuos sanos. Se encontró de manera general aumento máximo de la proliferación celular 48 horas posterior a la exposición a *Phytolacca*, y un aumento en la producción de TNF α para la dilución 14 CH. Concluimos que *Phytolacca americana* produce un aumento de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica y que en las diluciones 13, 14 y 18 CH se estimula la producción de TNF α , sin embargo, para el resto de diluciones, el efecto varía de manera individual.

Palabras clave: (Homeopatía, *Phytolacca americana*, Proliferación celular, MTT formazan, Factor de Necrosis Tumoral alfa.

Abstract

Phytolacca americana is a plant that prepared following the homeopathic method has been used for the management of diseases involving lymph nodes. In vitro, it is known to have an effect on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells, mainly lymphocytes and to affect the production of various cytokines. The aim of this study was to explore the effect of *phytolacca americana* on proliferation of mononuclear cells from

peripheral blood and the production of TNF α in consecutive dilutions between 12 and 18CH. Peripheral blood samples from 10 healthy individuals were used, cell viability was assessed using the MTT method [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] and TNF α production was quantified by ELISA. We found a general increase in cell proliferation up to 48 hours after exposure to phytolacca and an increase in the production of TNF α in the 14 CH dilution. In conclusion, *Phytolacca americana* produces an increase in the proliferation of peripheral blood mononuclear cells and 13, 14 and 18 CH dilutions stimulate the production of TNF α . However, remaining set of dilutions seem to have an effect that varies in an individual manner.

Keywords: homeopathy, phytolacca americana, cell proliferation, MTT formazan, Tumor Necrosis Factor-alpha

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de abreviaturas.....	XV
Introducción	1
1. Justificación	5
2. Objetivos.....	7
2.1 Objetivo General.....	7
2.2 Objetivos Específicos.....	7
3. Marco Teórico.....	8
4. Materiales y métodos.....	15
4.1 TIPO DE ESTUDIO	15
4.2 POBLACION Y MUESTRA	15
4.3 IDENTIFICACION DE VARIABLES O CATEGORÍAS DE ESTUDIO.....	15
4.3.1 Preparación de Phytolacca americana	15
4.3.2 Obtención de las células mononucleares de sangre periférica.....	16
4.3.3 Evaluación de la viabilidad celular con MTT.....	16
4.3.4 Determinación de concentración de TNF alfa por método ELISA.....	18
4.4 RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE INFORMACIÓN	18
4.4.1 Análisis Estadístico	18
5. Resultados.....	19
6. Discusión.....	24
7. Conclusiones y recomendaciones.....	27
7.1 Conclusiones	27
7.2 Recomendaciones.....	28
A. Anexo: Diseño de ELISA.....	31
Bibliografía	33

Lista de figuras

	Pág.
Gráfica 1 - Efecto in Vitro de <i>Phytolacca americana</i> homeopatizada sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica 48 horas de exposición	20
Gráfica 2. Efecto in Vitro de <i>Phytolacca americana</i> homeopatizada sobre los niveles de TNF α en células mononucleares de sangre periférica	22
Gráfica 3. Efecto in vitro de <i>Phytolacca americana</i> homeopatizada sobre los niveles de TNF α en células mononucleares de sangre periférica	23

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1 - Efecto in Vitro de Phytolacca americana homeopatizada sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica 48 horas de exposición	20
Tabla 2 - Análisis estadístico del efecto de las diluciones de Phytolacca americana sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica 48 horas de exposición.....	21

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

CH	Centesimal Hannemaniana
<i>TNFα</i>	Factor de Necrosis Tumoral alfa

Introducción

Parágrafo 269: “El método homeopático, por un procedimiento que le es propio y que nadie había ensayado antes que él, desarrolla las virtudes medicinales dinámicas de sustancias groseras, que les da a todas una acción profundamente eficaz y terapéutica, aún a aquellas que en el estado crudo no daban señal de la menor influencia medicinal sobre el cuerpo humano. Este cambio notable en las cualidades de las sustancias naturales desarrolla el latente poder dinámico, hasta entonces desconocido, como si hubiese permanecido oculto o adormecido, poder que influencia el principio vital y modifica el modo de ser de la vida animal. Esto se realiza por acción mecánica sobre sus más pequeñas partículas frotando y sacudiendo y después de añadir una sustancia indiferente en polvo o líquida que las separe entre sí. Este proceso se llama dinamizar, potenciar (desarrollo del poder medicinal) y los productos son las dinamizaciones o potencias en diferentes grados”. (1).

La homeopatía nace como un método terapéutico experimental desarrollado por el Doctor. Samuel Hahnemann hacia el final del siglo XVIII, gracias a sus conocimientos en química y sobre los síntomas producidos por diferentes tóxicos, y estableciendo una comparación con la sintomatología propia de algunas enfermedades, pe; la intoxicación producida por la quina produce síntomas similares a los producidos por la malaria. Hahnemann formula un mecanismo mediante el cual, diluyendo las sustancias, logra disminuir sus efectos tóxicos y, paradójicamente, obtiene su poder curativo (2).

Gran controversia ha generado el uso de diluciones consecutivas de sustancias preparadas bajo el método homeopático, es decir, con fuertes agitaciones, que de alguna manera, potencian el efecto curativo. Sin embargo, teóricamente teniendo en cuenta el número de Avogadro, podemos concluir que al llegar a la décimo segunda dilución

consecutiva de 1 parte de sustancia por 99 partes de solvente (Diluciones Centésimas Hahnemánianas – CH), no encontraremos vestigio alguno de la sustancia original, por lo tanto estaremos enfrentados solamente a la presencia de solvente (3). Es la “no presencia” de sustancia original alguna en la dilución la que ha generado una paradoja farmacológica, ya que la farmacodinamia de este tipo de preparaciones no puede ser explicada claramente. A pesar de este vacío epistemológico, la demostración de un efecto real ha sido de gran preocupación, permitiendo la elaboración de modelos como el desarrollado por POITEVIN, E. DAVENAS & J. BENVENISTE, en el que se demuestra la inhibición de la degranulación de basófilos con altas diluciones homeopatizadas de Lung his y Apis mel, sustancias de uso común en el tratamiento de alergias (4).

Tanto la homeopatía como la inmunología nacen al final del siglo XVIII, y han encontrado afinidad en su desarrollo, probablemente, debido a que la homeopatía encuentra en la inmunología un acercamiento hacia la explicación de su mecanismo de acción, utilizando la regulación endógena neuroinmunoendocrina como un camino hacia la curación (5). Gracias a ese nacimiento y desarrollo conjunto, es como se han diseñado numerosos modelos inmunológicos para explicar y demostrar tanto el mecanismo de acción como los efectos de las altas diluciones homeopáticas sobre los sistemas vivos.

La investigación en homeopatía ha pasado por varias etapas, estableciendo un desarrollo histórico relacionado con adelantos y descubrimientos en diferentes campos de la ciencia. La aparición de nuevas tecnologías e instrumentos de medición han permitido un mayor acercamiento hacia el mecanismo de acción de las sustancias ultradiluidas. La aplicación y experimentación clínica son principios fundamentales de la homeopatía, y su eficacia puede ser constatada con numerosos testimonios e historias relatadas por sus usuarios; sin embargo, la apremiante necesidad de establecer mecanismos de medición que permitan un acercamiento más objetivo, y una recolección más organizada de información en relación con la respuesta clínica, así como la necesidad natural de explicar y documentar interrogantes básicos generados por la práctica homeopática, tales como el mecanismo de acción, las dosis, el uso de las diluciones, entre otros, hacen que sea necesario establecer pilares de apoyo en ramas como la física, la matemática, la química, la farmacología, la toxicología, etc.

Aunque constantemente nos enfrentamos a limitaciones tecnológicas, los adelantos científicos de las últimas décadas nos han conducido a dilucidar parcialmente los interrogantes planteados frente a las sustancias dinamizadas. La construcción de modelos biológicos y la investigación con seres vivos o con sus células han sido de gran importancia para la exploración del efecto de estas sustancias, y sin embargo, los hallazgos obtenidos han generado nuevos interrogantes. De manera general sabemos que las sustancias ultradiluidas generan un efecto sobre los sistemas vivos, y que este efecto se relaciona con la individualidad, tanto del sistema vivo estudiado, como de la sustancia ultradiluida, así como de la dosis, la dilución y la dinamización o activación de la sustancia en relación con la aplicación de golpes o sucusiones. Estos principios fueron expuestos hace más de 200 años por un científico Alemán, y pueden ser reproducidos y corroborados hoy en día en nuestros laboratorios. Sin embargo, a pesar de múltiples acercamientos, y de saber que el solvente en el que se realiza la dilución exhibe cambios en sus propiedades físico químicas con respecto a un solvente preparado de una forma diferente a la desarrollada por el método homeopático, aun encontramos vacíos acerca del mecanismo de acción de la sustancia homeopatizada.

La interacción de un solvente que guarda la memoria de un sustrato y la activación de las moléculas de este solvente a partir de pequeños golpes, genera en un organismo vivo un efecto medible, que puede ser una respuesta clínica o un cambio comportamental. Este es nuestro principio empírico, de donde partirán numerosas propuestas, cuyo objetivo, quizá no muy lejano, será la demostración del mecanismo de acción de la sustancia altamente diluida bajo el método homeopático, y aunque no conocemos la razón de la acción, sabemos que la reacción está presente y que hay una relación causa-efecto claramente establecida. Los nuevos interrogantes deben considerar la importancia de la individualidad, tanto del organismo vivo, como de la dilución homeopática. La respuesta a la causalidad, probablemente para nuestros días, parezca irracional o ininteligible, sin embargo, el efecto de las sustancias altamente diluidas es claro y demostrable. Esperamos que el futuro de la investigación permita dilucidar aquello que, con tanto interés nos atañe, el mecanismo de acción de los medicamentos homeopáticos.

1. Justificación

La continuación de la fase II de la línea de investigación que busca determinar el efecto inmunomodulador de altas diluciones de *Phytolacca americana*, pretende explorar los efectos de las diluciones comprendidas entre la 12 a la 18 CH, con el fin de valorar el efecto dosis respuesta, que en trabajos previos ha mostrado un comportamiento sinusoidal, no lineal, buscando comparar la magnitud de la respuesta en cada una de las diluciones mencionadas. Se determino la medición del factor TNF- α , debido a los resultados obtenidos en la fase II, donde se evidenció un efecto inmusupresor selectivo significativo sobre esta citoquina (6).

Estos trabajos buscan desarrollar un modelo que permita evaluar el efecto biológico de medicamentos homeopáticos sobre células mononucleares de sangre periférica humana, lo cual podría ser utilizado como herramienta para controlar la calidad de los medicamentos diluidos y dinamizados y permitiría perfeccionar la escogencia del medicamento en pacientes con patologías que pudieran ser tratadas con este medicamento.

Este tipo de proyectos han permitido estudiar algunos de los mecanismos de acción y respuestas celulares frente a diluciones homeopáticas promoviendo así la Investigación en medicina alternativa y fortaleciendo los grupos y líneas de investigación.

Reconocemos la individualidad en la práctica homeopática, sin embargo, con el fin de establecer un dialogo entre las prácticas ortodoxas y las nuevas líneas de investigación en homeopatía, recurrimos a uno de los principios de la homeopatía, la “*experimentación pura*”, que consiste en administrar sustancias ultradiluidas a individuos sanos, con el fin obtener diferentes respuestas o síntomas, que constituyen la patogenesia de dicha sustancia. Para nuestro caso, administraremos una sustancia altamente diluida, *Phytolacca americana*, a poblaciones de células mononucleares de sangre periférica

humana, obtenidas de individuos sanos, con el fin de observar la respuesta inmunomoduladora de dichas células frente a la preparación homeopática.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Explorar el efecto de altas diluciones de *phytolacca americana* sobre células mononucleares de sangre periférica

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1** Determinar El efecto mitogénico de diluciones homeopatizadas de *Phytolacca americana* sobre el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en células mononucleares de sangre periférica humana, mediante metodología de ELISA
- 2.2.2** Explorar el efecto de altas diluciones de *phytolacca americana* sobre mitogénesis de células mononucleares de sangre periférica humana.
- 2.2.3** Explorar el efecto de diluciones homeopatizadas consecutivas entre la 12 y la 18 CH de *phytolacca americana* sobre células mononucleares de sangre periférica humana y sobre TNF- α

3.Marco Teórico

Son varios los principios que rigen la práctica homeopática, desde la formulación teórica expuesta por su precursor, Samuel Hahnemann, se formulan dichos principios, tales como el principio de la “similitud”: “se emplea para la totalidad de los síntomas de una enfermedad natural un medicamento capaz de producir los síntomas más semejantes posible en el individuo sano, administrado en dosis apropiada es el único método eficaz por medio del cuál las enfermedades, que constituyen solamente desarreglos dinámicos de la fuerza vital, son dominadas y de este modo perfecta y permanentemente extinguidas, debiendo necesariamente dejar de existir” (7). O el principio de “mínimas dosis”, alcanzado gracias a la dinamización o potenciación de diferentes sustancias (8). Tomando como punto de partida estos y otros principios de la práctica homeopática, se han desarrollado diferentes modelos biológicos que involucran plantas, roedores, células humanas, entre otros, con el fin de corroborar y observar mejor los efectos de las sustancias altamente diluidas (2, 9, 10, 11).

Basados en el pensamiento de Hahneman las nuevas corrientes definen la homeopatía como un sistema médico complejo ya que cumple con una morfología particular, un sistema de diagnóstico, tratamiento y pronóstico que pertenecen a ella (12).

El método homeopático

La homeopatía nace como un sistema terapéutico de final del siglo XVIII e inicio del siglo XIX, se rige por principios descritos por su fundador, Samuel Hahnemann, quien con base en observaciones acerca de los efectos de diferentes sustancias sobre la salud, y el efecto de la mismas sobre las enfermedad, logra formular un método experimental que ha permanecido por más de 200 años. A continuación se hará una breve revisión de algunos de estos principios:

Similitud: Inspirado en Aristóteles y sus observaciones sobre la similitud como un fenómeno terapéutico, y experimentando en si mismo la aparición de fiebre intermitente

producida por la corteza de quina, seguido de numerosas experiencias sobre si mismo, deduce su teoría acerca de la curación de enfermedades con sustancias que fueran capaces de producir en el hombre sano los mismo síntomas propios de la enfermedad; formulando una hipótesis: “la enfermedad medicamentosa artificial substituye a la enfermedad natural”(13). Es entonces como con numerosas observaciones y experimentaciones, tanto en el mismo como en diferentes personas, se confirma la hipótesis Hipocrática “las sustancias medicamentosas son capaces de curar síntomas similares a los que pueden producir”(14).

Se puede concluir entonces que si a una persona que padezca unos síntomas específicos, se le administra la sustancia que, preparada bajo el método homeopático, induzca los mismos síntomas en individuos sanos, se obtendrá la resolución de dicha sintomatología. Las sustancias en dosis homeopáticas producen un efecto inverso al de su acción tóxica, cuando son administradas a individuos enfermos y producirá los síntomas propios de su toxicología en individuos sanos (15) permitiendo formular otro de los principios de la homeopatía: la experimentación pura.

Experimentación pura: Consiste en la administración de sustancias altamente diluidas a individuos sanos, identificando los síntomas que dicha sustancia produce, configurando así la patogenesia de la sustancia. La patogenesia se obtiene inicialmente de la información recogida sobre la administración de dosis ponderales de la sustancia, a individuos sanos, dicha información consignada en tratados de toxicología o Materias médicas antiguas. Instrumentos que recolectaban información acerca de la sintomatología propia de diferentes fuentes naturales, plantas, metales, animales, etc. Sin embargo, en la actualidad, dadas las condiciones éticas, la experimentación de sustancias, particularmente tóxicas, se realiza diluyéndolas, bajo el método homeopático, para eliminar así el efecto tóxico y los posibles daños pudieran ocasionarse a un individuo sano (15). La experimentación pura, es entonces reconocida como un método seguro, debido a que la dosis administrada, estaría lejos de ocasionar un efecto fisiopatológico deletéreo, dejando únicamente, una serie de síntomas tanto físicos como mentales, que permitirán la configuración de la patogenesia. Fuentes adicionales como los registros de síntomas producidos en intoxicaciones, recolectados de los registros de historias clínicas o de las anécdotas postexposición a tóxicos, nos permiten inferir que al administrar estos tóxicos ultradiluidos por el método homeopático y a la luz del fenómeno

de similitud, podrían permitir su uso de manera terapéutica, basados en los principios de la curación en homeopatía.

Dosis mínimas: Producto de numerosas experiencias terapéuticas, Hahnemann logra descubrir que aún, utilizando la premisa de la similitud, dosis ponderales de las sustancias, actúan con tal intensidad, que llegan a ser innecesarias, por ello formula la propuesta de usar la dosis más baja que obtenga un efecto hacia la curación, de manera tal, que si el uso de una dilución determinada genera una respuesta exagerada en el individuo, recomienda usar dosis más diluidas. El objetivo no es entonces producir síntomas que incomoden tanto a los sujetos de estudio como a los sujetos a tratar, sino de una manera sutil acercarse a la estimulación del organismo, para conseguir en él su curación (16)

Fueron necesarias numerosas experiencias tanto en individuos sanos como en enfermos, las que llevaron a Hahnemann a formular su teoría, describió que el uso de dosis altamente diluidas producían efectos observables. Con el fin de actuar de la manera más sutil, realiza diluciones consecutivas de las sustancias, llevándolas a tal punto en que se hace improbable la presencia de moléculas, hallazgos que serían avalados por el científico contemporáneo Amedeo Avogadro, quien realiza descubrimientos sobre el número de moléculas contenidas en gases en condiciones ideales. Considerando entonces que bajo el método homeopático, diluyendo sustancias 1/100, conocidas como centesimales Hahnemannianas (CH), cercanos a la 10 CH, habremos sobrepasado la posibilidad de encontrar moléculas de la sustancia en la dilución (3). . Por lo tanto, teóricamente estaremos únicamente frente al solvente, lo cual constituye un reto para el dialogo entre la farmacología alopática y el método homeopático, y sin embargo, la demostración experimental y la observación de efectos claros en la sintomatología de individuos sanos y las curaciones de individuos sintomáticos, fueron el único apoyo de estas teorías durante muchos años. Gracias a nuevos instrumentos de medición, desarrollos tecnológicos y a la profundización y conocimiento de la inmunología, se han podido desarrollar experiencias en las últimas décadas, que demuestran, de manera irrefutable, la presencia de un efecto claro de aquel “solvente” en el que existió una sustancia con un poder farmacológico.

Phytolacca Americana

La *Phytolacca americana* proviene de un arbusto de la familia de las Fitolacáceas, mide entre 1 y 2 metros de altura, y es originaria de América del norte, sus hojas son grandes y ovaladas, es rica en nitrato de potasio, hemaglutininas, ácido gamma aminobutírico. Contiene saponosidos, que explican su actividad y uso como antiinflamatorio, efecto que le ha conferido su uso común como planta antirreumática, (16), entre sus componentes activos se destaca el pokeweed, un mitógeno que in vitro promueve la transformación linfoblástica y estimula linfocitos B y T; además contiene, histamina, - ácido gamma-aminobutírico, entre otros. La experimentación patogenética en homeopatía ha mostrado la aparición de adenopatías cervicales (17). Autores como Hale, la describen como “uno de nuestros más valiosos y poderosos remedios indígenas”, que han mostrado importantes efectos en el individuo sano, permitiendo su uso en afecciones crónicas como reumatismos, pero también en enfermedades agudas como en la difteria. Expresa un efecto medicinal sobre afecciones que comprometen a las glándulas mamarias, hasta tal punto que Kent menciona “parece que todo el remedio se centra en las glándulas mamarias”. Se describen usos en patologías que exhiben tumores adiposos, o con propósitos de adelgazamiento. (18) Las raíces secas de *phytolacca americana* se usan en medicina china para el tratamiento de tumores (19).

Las patogenesis en homeopatía, permiten la identificación de síntomas, producidos por sustancias altamente diluidas sobre individuos sanos; teniendo en cuenta la capacidad mitogénica de *Phytolacca americana*, y su acción sobre células inmunológicas, manifestado como adenopatías múltiples, corroboradas clínicamente, se escoge este compuesto para la experimentación en laboratorio, esperando un resultado similar en la experimentación sobre células mononucleares de sangre periférica humana.

Factor de Necrosis Tumoral Alfa

El TNF α es una glicoproteína identificada en 1975, demostrando inicialmente, un efecto sobre células malignas de tumores transplantados a ratones, causando necrosis hemorrágica de los mismos. (20). Exhibe funciones importantes en procesos infecciosos, tumorales e inflamatorios, es producido principalmente por macrófagos y linfocitos T, (21) El aumento de sus niveles séricos se relaciona con la aparición de procesos pro-inflamatorios o infecciosos, y con la severidad de los mismos. (22, 23). El factor de

necrosis tumoral induce la producción de ciclooxygenasa 2, siendo importante como mecanismo proinflamatorio, además de favorecer trombosis intravascular por la estimulación de proteínas procoagulantes. (24)

Investigación en Homeopatía

La formulación de modelos experimentales en homeopatía, se sustenta en uno de los principios fundamentales, enunciado por el creador del método homeopático, Samuel Hahnemann, conocido como la experimentación pura. Este principio se constituye como uno de los primeros modelos y base de la terapéutica. Consiste en suministrar sustancias altamente diluidas a individuos sanos, con el fin de producir en estos numerosos síntomas que serían consignados y almacenados. La sumatoria en la experimentación de numerosos homeópatas, ha generado un compendio sintomático, constituyendo repertorios como herramientas para la terapéutica. La observación y experimentación sumados a la evidencia dada por la experiencia, han sido el campo de inicio en la investigación, el desarrollo de técnicas de medición y recientes descubrimientos científicos, han permitido la integración experimental y empírica constituyendo 4 ejes: Investigación biológica experimental, investigación clínica, investigación físico-química, investigación holística (25).

Es claro que aún no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de las sustancias altamente diluidas y menos aún la razón del efecto de las succiones de dichas sustancias. Sin embargo, distintos modelos experimentales han logrado demostrar y reproducir efectos sobre poblaciones celulares, animales, entre otros, constituyendo modelos biológicos que permiten observar dichos efectos (11). La investigación biológica experimental encuentra su origen en Francia cerca de la mitad del siglo XX, consecuencia de trabajos que demostraron la ausencia de moléculas en diluciones que sobrepasaban el número de Avogadro (25). Sobre este eje de investigación, y particularmente determinando la respuestas celulares, se han diseñado numerosos trabajos (8), recientemente, y en relación con una sustancia de interés en inmunología, como es la *Phytolacca americana*, se publica un artículo, que demuestra los efectos de diferentes sustancias ultradiluidas, sobre células de adenocarcinoma de mama humana, encontrando arresto del ciclo celular, así como inducción de apoptosis, mediadas por alteraciones en la expresión de diferentes proteínas reguladoras (26). Otros

experimentos en células inmunitarias, demuestran efectos claros como linfoproliferación en cultivos celulares tratados con un complejo homeopático llamado Cannova (27).

Múltiples estudios se enfocan en algunas de las diluciones que han demostrado efecto. Sin embargo, son pocos los experimentos publicados, que muestran efectos de altas diluciones sucesivas. Se destaca el estudio realizado por Poitevin, en el que la degranulación de basófilos obtuvo diferentes respuestas al exponer diluciones sucesivas entre la 1 y la 20 CH de Apis mellifica e histamina de pulmón, obteniendo una curva pseudosinusoidal al tabular los resultados (4).

Hormesis

Uno de los grandes interrogantes sobre el funcionamiento de los medicamentos homeopáticos, se erige sobre su dosificación y cantidad de principio activo, sustancias como el arsénico, mercurio, plomo, entre otros, que exhiben propiedades tóxicas, constituyéndose de acuerdo a la dosis en venenos, encuentran bajo el método homeopático, propiedades terapéuticas. Los organismos vivos, expresan respuestas según los grados de exposición a diferentes noxas, esta respuesta se describe de manera no lineal y se constituye como un mecanismo adaptativo y de compensación. (28). A este comportamiento se le denomina con el término Hormesis, que describe el efecto dosis respuesta, bajo un patrón bifásico, en el que una exposición a dosis altas de una condición tóxica genera un efecto deletéreo sobre la célula o el organismo, en tanto con dosis bajas se logra un efecto adaptativo y benéfico. Numerosos ejemplos apoyan este concepto, uno de ellos, es a exposición de células de corazón o cerebro a situaciones controladas y periodos breves de isquemia, logrando así, una mayor resistencia de estas células frente a situaciones más severas de isquemia. (29).

Bajo la luz del concepto de Hormesis, las diluciones de las sustancias bajo el método homeopático, constituyen un método para la estimulación de organismos vivos, generando un efecto benéfico, y produciendo respuestas adaptativas y curativas frente a condiciones que alteran la homeostasis, este concepto fue analizado y expresado por Samuel Hahneman en su obra, mencionándolo como la acción primaria del agente morbífico artificial y la propia respuesta del organismo como acción secundaria o acción curativa. (30).

4. Materiales y métodos

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo in vitro, sobre células mononucleares de sangre periférica humana de pacientes sanos.

4.2 POBLACION Y MUESTRA

- Células mononucleares de sangre periférica de 10 voluntarios sanos con edades comprendidas entre 20 y 40 años.
- Toma de muestras en ayuno
- Realización de historia clínica para descartar sujetos que presentaran sintomatología infecciosa un mes previo a la toma de la muestra.
- No se incluirán individuos con antecedente de enfermedad crónica, especialmente las relacionadas con el sistema inmune.
- No se incluirán individuos que reciban tratamiento farmacológico o tratamiento homeopático.

4.3 IDENTIFICACION DE VARIABLES O CATEGORÍAS DE ESTUDIO.

4.3.1 Preparación de *Phytolacca americana*

Las diluciones homeopáticas de *Phytolacca americana* fueron preparadas en la Farmacia Homeopática Equilibrio de Bogotá, de acuerdo a la farmacopea homeopática de los Estados Unidos Mexicanos según la regla No. 3 para la escala centesimal (31): Seis volúmenes (gotas) de tintura madre (Importada de Farmacia Hahnemann, Santiago

de Chile, distribuida bajo formulación médica en la Farmacia Homeopática Similia de Bogotá) con noventa y cuatro volúmenes de SSN constituyen la dinamización 1CH (Centesimal Hahnemaniana). Un volumen de la dinamización 1CH con noventa y nueve volúmenes de SSN constituyen la dinamización 2CH. Las dinamizaciones subsecuentes se preparan con un volumen de la dinamización anterior y noventa y nueve volúmenes de SSN hasta obtener las dinamizaciones consecutivas hasta la 18 CH. Se utiliza solución salina con el fin de obtener un medio isotónico para las células, conservando su viabilidad. Cada dinamización requiere de succusiones, esto consiste en realizar sacudidas energéticas 100 veces a la dilución respectiva.

Teóricamente la dilución homeopática 12 CH, equivale a una dilución 1×10^{-24} M, en la cual virtualmente no existirían unidades elementales del soluto inicial, determinado por el número de Avogadro (8).

4.3.2 Obtención de las células mononucleares de sangre periférica

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

4.3.3 Evaluación de la viabilidad celular con MTT

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

las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. (32, 33).

Para evaluar el efecto del compuesto *Phytolacca americana* sobre las células mononucleares de sangre periférica obtenidas que fueron utilizadas para los experimentos, inmediatamente después de ser aisladas fueron mantenidas a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂ en el medio de cultivo celular RPMI suplementado con 10% de suero del mismo paciente, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de penicilina estreptomycin. La evaluación de la toxicidad se realizó en cajas de cultivo de 96 pozos en los cuales se sembraron 1x10⁵ células por pozo contenidas en un volumen total de 150µl. Las células se sembraron por triplicado, para cada dilución de compuesto y se utilizaron 6 pozos sin adición del compuesto o pozos control. El tratamiento con el compuesto se llevo a cabo adicionando 2, 4, 6, 8, 10 y 12µl de las diluciones 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 CH de *Phytolacca americana* por triplicado. El efecto de la *Phytolacca americana* se evaluó a las 48 y 72 horas por el método colorimétrico de MTT. Para esto, una vez cumplido el tiempo del tratamiento, el medio de cultivo fue retirado de cada pozo y se adicionaron 100µl de la solución de MTT preparada en medio de cultivo RPMI sin suero y fueron incubadas por 4 horas a 37°C. Cumplido este tiempo de incubación se retiró el MTT de los pozos, y los cristales de formazan formados por la células vivas fueron disueltos adicionando a los pozos de cultivo 100µl de dimetilsulfóxido DMSO e incubados en oscuridad por 15 minutos. Se obtuvieron lecturas de absorbancia a 595nm en un lector de placas Humareader utilizando como blanco 3 pozos con el disolvente DMSO.

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

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

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

4.3.4 Determinación de concentración de TNF alfa por método ELISA

Siembra de 300000 células por pozo, por duplicado de 10 pacientes sanos, tratados con *Phytolacca americana*, se recogió el sobrenadante, y se valoró la concentración de TNF alfa utilizando el kit de ELISA suministrado por el laboratorio Abcam cat no. 46088. Se utilizó la metodología según las especificaciones del fabricante.

4.4 RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE INFORMACIÓN

4.4.1 Análisis Estadístico

Con los datos de absorbancia obtenidos de de los ensayos de citotoxicidad con MTT se calculó el promedio y la desviación estándar tanto de las muestras tratadas con *Phytolacca Americana* como el tratamiento control. Posteriormente se obtuvieron los porcentajes de viabilidad de los tratamientos con respecto a los valores del control para cada concentración ensayada; a partir de estos datos se construyeron curvas dosis respuesta y se obtuvo la concentración letal 50 (CL50). Se realizó test de ANOVA de un factor para hallar las diferencias en los datos seguido de un test de Tukey utilizando el software SPSS.

5.Resultados

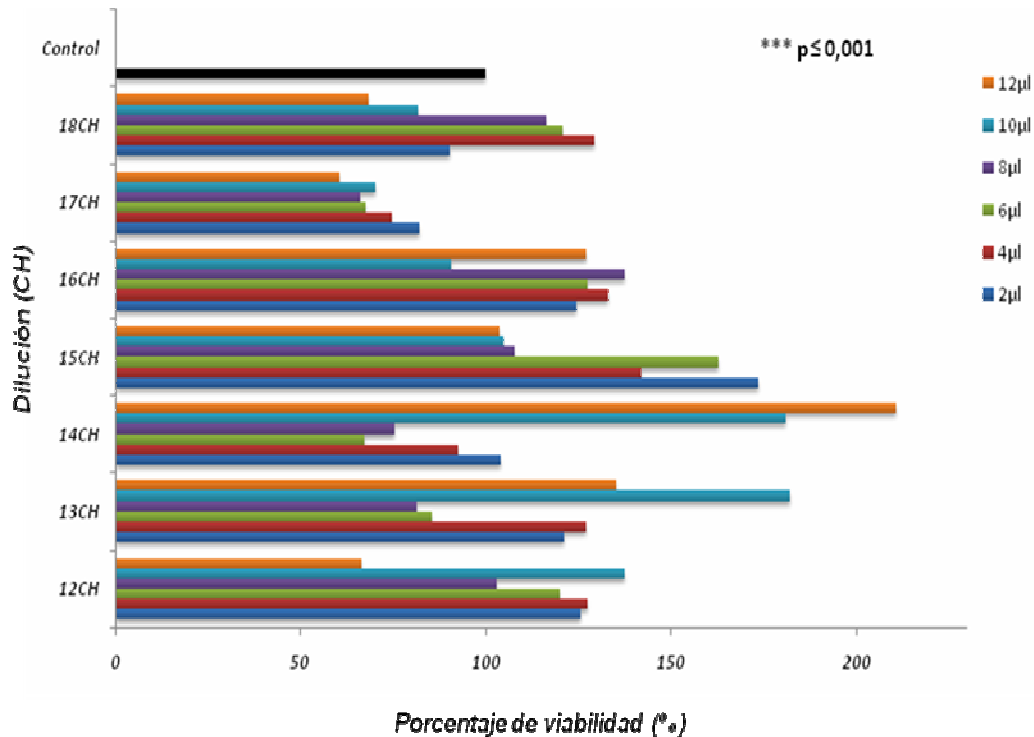
Teniendo en cuenta los resultados de experiencias previas, en las que *Phytolacca americana* preparada bajo el método homeopático exhibe un efecto mitogénico sobre células mononucleares y un efecto de disminución en la producción de TNF alfa, se tomaron estas dos variables para comparar la respuesta de las células pero en diluciones consecutivas de *Phytolacca americana* desde la 12 CH hasta la 18 CH.

Efecto sobre la viabilidad celular

Se determinó el porcentaje de viabilidad celular con MTT medido a las 48 y a las 72 horas posteriores a la aplicación de dosis comprendidas entre 2 y 12 microlitros, encontrando el mayor porcentaje de viabilidad (210%) para la dilución 14 CH a las 48 horas, y para una cantidad de 12 microlitros de la dilución. Sin embargo con una cantidad de 10 microlitros se observa un efecto considerable con un porcentaje de 181 % para la misma dilución. La dilución 15 CH (utilizada en la fase II) muestra un efecto mitogénico con una viabilidad celular superior al 140 % en cantidades de 2, 4 y 6 microlitros, en tanto que cantidades de 8, 10 y 12 microlitros se acercan al control con porcentajes inferiores al 110 %. (gráfica 1)

Posterior a la realización del análisis estadístico, se observa que particularmente para la dilución 17 CH, se observa una disminución en la proliferación celular con un 70 % con respecto al control. El resto de diluciones muestra un aumento en la proliferación celular, con porcentajes entre 101 % y 132 %, siendo la dilución 15 CH la que muestra un mayor efecto. (tabla 3).

Se observa que el porcentaje de viabilidad celular, depende tanto de la dilución como de la cantidad de medicamento administrada, sin expresar una relación lineal (tabla 2)

Gráfica 1 - Efecto in Vitro de *Phytolacca americana* homeopatizada sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica 48 horas de exposición**Tabla 1** - Efecto in Vitro de *Phytolacca americana* homeopatizada sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica 48 horas de exposición

Diluciones <i>Phytolacca</i> <i>Americana</i>	Porcentaje de Viabilidad (%)							
	12CH	13CH	14CH	15CH	16CH	17CH	18CH	Control
2µl	125.53	121.12	104.11	173.52	124.55	82.10	90.23	100
4µl	127.56	127.13	92.26	142.03	133.14	74.48	129.34	100
6µl	120.11	85.40	67.04	162.9	127.3	67.46	120.79	100
8µl	102.67	81.26	75.25	107.84	137.46	66.10	116.22	100
10µl	137.46	182.20	181.18	104.87	90.48	70	81.51	100
12µl	66.40	135.35	210.64	103.77	126.88	60.52	68.14	100

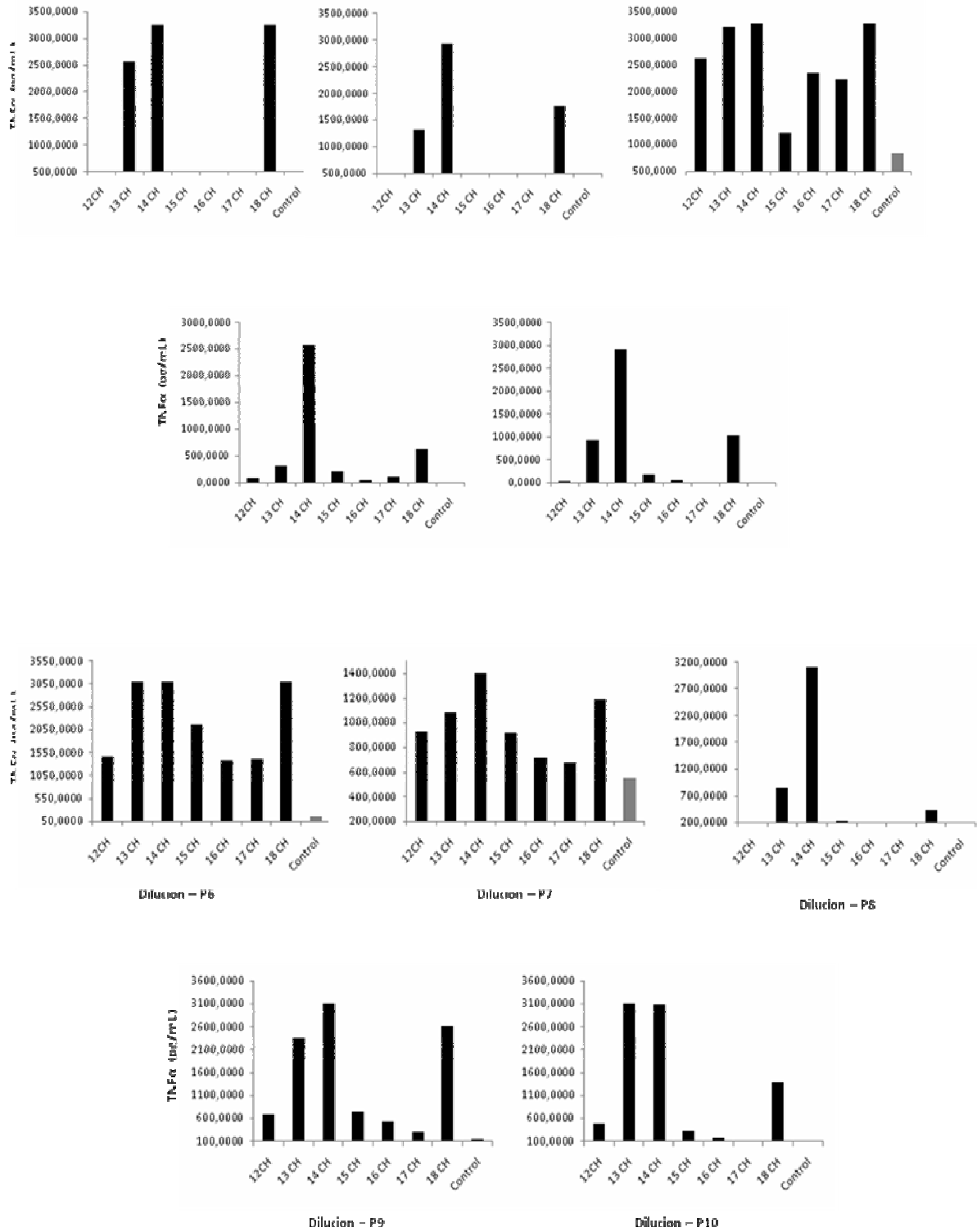
Tabla 2 - Análisis estadístico del efecto de las diluciones de *Phytolacca americana* sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica 48 horas de exposición

Diluciones <i>Phytolacca Americana</i> (CH)	12CH	13CH	14CH	15CH	16CH	17CH	18CH
Media	113.3	122.1	121.8	132.5	123.3	70.12	101.0
<i>t, df</i>	t=10.81 df=5	t=8.092 df=5	t=5.002 df=5	t=10.37 df=5	t=18.02 df=5	t=23.03 df=5	t=10.10 df=5
Valor <i>P</i> (dos colas)	0.0001	0.0005	0.0041	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002
Significancia ($p \leq 0.05$)	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

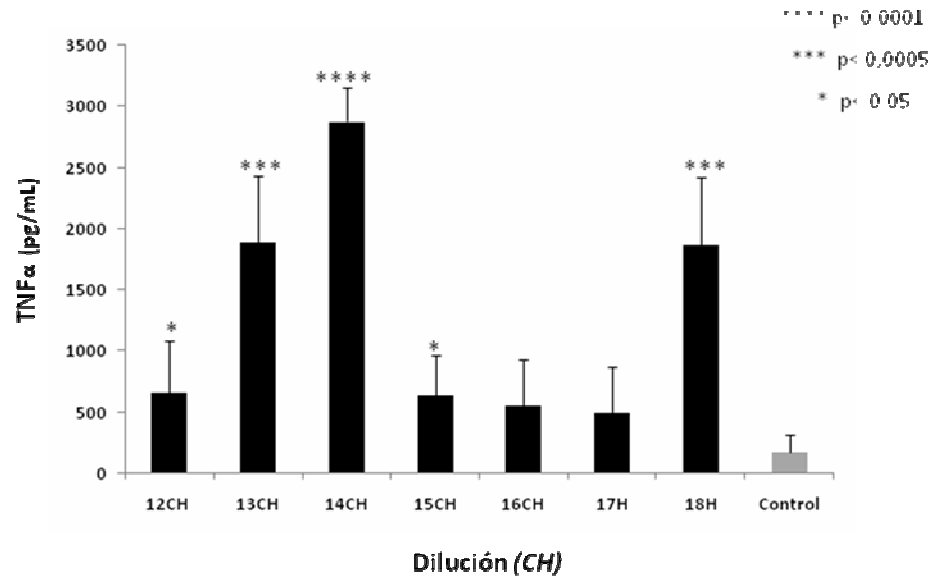
5.2. Efecto sobre la producción de TNF- α

Tomando como base los resultados de viabilidad celular, en los que se observa el mayor efecto de proliferación celular a las 48 horas posteriores a exposición, se administraron 10 microlitros de *Phytolacca americana* a cada muestra, de diluciones comprendidas entre la 12 y la 18 CH, se analizaron los sobrenadantes de las muestras con el método Elisa, se determinó la concentración de TNF alfa, encontrando que para la 14 CH, consistentemente, se demuestra un aumento en la producción de esta citoquina ($p < 0.0001$), las diluciones 13 y 18 CH muestran un efecto menor. Las demás diluciones se acercan al control.

Gráfica 2. Efecto in Vitro de *Phytolacca americana* homeopatizada sobre los niveles de TNF α en células mononucleares de sangre periférica



Gráfica 3. Efecto in vitro de *Phytolacca americana* homeopatizada sobre los niveles de TNF α en células mononucleares de sangre periférica



6. Discusión

Son varios los campos de investigación en homeopatía, el interés natural y científico de diferentes grupos y la necesidad de responder o aclarar numerosos interrogantes planteados desde el conocimiento y la aplicación del método homeopático, han llevado al desarrollo de una gran cantidad de experiencias que pueden ser agrupadas en distintos ejes, la investigación clínica, biológica, físico-química y holística. Desde las diferentes visiones y conceptos planteados por sus doctrinas, se lleva la homeopatía al laboratorio, diseñando modelos que expliquen el modo de acción del remedio homeopático, desde cada uno de los ejes planteados. (25)

Nuestro trabajo, se enfoca en la investigación biológica experimental, que surge como consecuencia de los interrogantes planteados por el mecanismo de acción de diluciones en las cuales, teóricamente, no se podría demostrar la presencia de moléculas del soluto inicial (25). Ha sido de especial atención el uso de modelos biológicos para la experimentación y demostración de la actividad de las altas diluciones, en particular y en relación con el desarrollo de la inmunología, se han propuesto modelos que determinen el efecto de las altas diluciones sobre células, recientes estudios evidencian un efecto citotóxico de *Phytolacca americana* en ultra diluciones, disminuyendo la viabilidad de 2 tipos celulares de cáncer de seno (MCF-7 and MDA-MB-231) (26)

En la fase II del proyecto que explora el efecto de *phytolacca americana* sobre linfocitos humanos, se encontró una respuesta de linfoproliferación a las diluciones homeopáticas 6, 15 y 30CH, exhibiendo un mayor efecto con la 6 CH, también se encontró disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias TNF alfa, IL6 e IL10 con las mismas diluciones(6).

Para nuestro experimento partimos de los hallazgos mencionados de la fase II, para lo cual tomamos la citoquina TNF α sobre la cual se evidenció un claro efecto sobre la

disminución en su producción en las diluciones 6, 15 y 30 CH. Analizamos la proliferación de células mononucleares y la producción de $\text{TNF}\alpha$ en diluciones consecutivas entre la 12 y 18 CH, con el fin de corroborar los hallazgos previos y de valorar el efecto con respecto a variaciones en las diluciones, y el efecto dosis respuesta. En general, para la mayoría de las diluciones, se observa un aumento en la proliferación celular, mostrando picos en las diluciones 13, 14 y 15 CH, $p < 0,001$ (ver gráfica 1). Esta observación, corrobora los hallazgos obtenidos en la fase II, en donde se determina el efecto mitógeno de la phytolacca americana, y se contrasta en el principio homeopático de la similitud, con los hallazgos que demuestran un efecto citotóxico sobre células tumorales (26), es decir, en células de individuos sanos, se encontrará un efecto proliferativo, mientras que en celular tumorales o “enfermas”, el efecto será supresor de la proliferación.

Con respecto a la producción de $\text{TNF}\alpha$, se observa un hallazgo interesante, y es la respuesta individual en la mayoría de diluciones, con un hallazgo consistente y paradójico, como lo es la elevación en la producción de $\text{TNF}\alpha$ para la dilución 14 CH $p > 0.0001$, este efecto también es consistente para las diluciones 13 y 18 CH. No se observa un efecto para la disminución de $\text{TNF}\alpha$ con la dilución 15 CH, hallazgo contrario al encontrado en la fase II.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

La investigación biológica en homeopatía ha permitido encontrar resultados que confirman las hipótesis planteadas por los precursores de este método terapéutico. Principios como el de la individualidad, dosis mínimas, similitud, han podido ser comprobados, a pesar de encontrarse de manera paralela resultados paradójicos. En nuestro experimento comprobamos y corroboramos los hallazgos obtenidos en la segunda fase, *Phytolacca americana* en altas diluciones, estimula la proliferación de células mononucleares de sangre periférica, evidencia que soporta la aplicación clínica, en la cual, bajo el principio de similitud, puede ser usada en individuos que exhiban adenopatias, linfoproliferación o enfermedades tumorales, sin embargo, llama la atención que el efecto no tiene una relación directa con la dosis, ni con la dilución, de tal manera que algunas diluciones, tales como la 15CH y la 16 CH exhiben un mayor efecto sobre la proliferación celular, que diluciones como la 17CH que muestra aumento en la toxicidad. También se observan diferentes respuestas en relación con la cantidad de dilución aplicada, sin evidenciar una regla matemática clara.

Llama la atención, y en contraste con los resultados obtenidos en la fase II, en donde se observo un efecto supresor para TNF α con la dilución 15 CH, con respecto a nuestro experimento, en el que se obtuvo, de manera consistente, para todos los individuos, un aumento en la producción de esta citoquina, con la dilución 14 CH. En los diferentes individuos, y para el resto de las diluciones, se encontró una respuesta individual, con una tendencia hacia el aumento de la producción en las diluciones 13 CH y 18 CH, pero mostrando un comportamiento pseudosinusoidal como el descrito en trabajos previos (ver gráfica 3) (4)

7.2 Recomendaciones

Es evidente que el principio de la individualidad parece no solo regir a la persona que presenta la sintomatología, es también una propiedad tanto de la dilución como de la dosis, por lo tanto, la práctica clínica de la homeopatía, se convierte más que en un ejercicio de aplicación y técnico, en un arte, que requiere de experiencia y de observación. Aunque no es claro el principio de acción de los medicamentos homeopáticos, se sabe que ejercen un efecto sobre los sistemas biológicos, exhibiendo un tropismo sobre algunos tipos celulares, órganos o personas, pero mostrando un efecto consistente para la mayoría de individuos, que puede permitir formular algunas “reglas” enmarcadas en el contexto de la experimentación causa-efecto. Es necesario diseñar diversos modelos biológicos que permitan comparar las respuestas, no solo individuales, sino colectivas, y la relación de las mismas con las dosis o cantidades administradas y con las diluciones aplicadas. Es probable que cada remedio homeopático genere resultados, como los obtenidos en esta experiencia; sin embargo, la experimentación y la comparación con los resultados obtenidos en la investigación clínica, serán el punto de partida para promover un uso adecuado de los remedios homeopáticos, a partir del conocimiento de los mismos.

A. Anexo: Diseño de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	CURVA											
C												
D												
E												
F												
G												
H												
I												
	10 µl de dilución, análisis para 48 horas											
	Total de muestra: 10 Pacientes											
	16 pozos por paciente											
	TNF alfa											
	300000 cels por paciente											

Bibliografía

1. HAHNEMANN S., Organon de la Medicina, Parágrafo 269, Encyclopaedia Homeopathica. Archibel 2006.
2. Bellavite P., Conforti A., Piasere V. y Ortolani R. Immunology and Homeopathy. 1. Historical Background. Evid Based Complement Alternat Med. 2005 Dec;2(4):441-52
3. Bastide M. y Solon M. El principio de infinitesimalidad – Homeopatía Capítulo 11.2 – Encycl. Med. Nat. – Editions Frison-Roche. Paris, Francia 1995
4. Poitevin B, Davenas E, Benveniste J. In vitro immunological degranulation of human basophils is modulated by lung histamine and Apis mellifica. Br J Clin Pharmacol. 1988 Apr;25(4):439-44
5. Bellavite P, Conforti A, Piasere V, Ortolani R. Immunology and homeopathy. 1. Historical background. Evid Based Complement Alternat Med. 2005 Dec;2(4):441-52
6. Hernandez L. Exploración del efecto de altas diluciones sucesionadas (Medicamento Homeopático) de Phytolacca americana sobre linfocitos humanos. Fase II (Trabajo de grado). Bogota. Universidad Nacional de Colombia. 2010
7. Hahnemann S. Parágrafo 70. Organon de la Medicina. Encyclopaedia Homeopática. Archibel Software. 2006
8. Bellavite P., Pontarrollo F., Pitari G. and Conforti A. Immunology and Homeopathy 5. The Rationale of the 'Simile'. Evid Based Complement Alternat Med. 2007; June; 4(2):149–63
9. Majewsky V, Arlt S, Shah D, Scherr C, Jäger T, Betti L, et al. Use of homeopathic preparations in experimental studies with healthy plants. Homeopathy. 2009;98(4):228-43.
10. Yan Wijk R, Clauçsen J, Albrecht H. The rat in basic therapeutic research in homeopathy. Homeopathy. 2009;98(4):280-6.
11. Fisher P. Biological models of homeopathy. Homeopathy. 2009;98(4):183-5)

12. Luz MT. Comparação de representações de corpo, saúde, doença e tratamento em pacientes e terapeutas de homeopatia, acupuntura e biomedicina. Rio de Janeiro: Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 1998. (Série Estudos em Saúde Coletiva)
13. Demarque D., El método Hahnemaniano. Homeopatía, Capítulo 1.2. Encicl. Med. Nat. Ediciones Frison – Roche. (Paris, Francia), 1995
14. Jouanny J., Crapanne B., Dancer H., Masson J. Terapéutica Homeopática – Tomo 1. Tercera Edición: Francia. 2000
15. Guermonprez M. Principio de similitud y concepto de patogenesia. Introducción a la Materia médica – Enciclopedia Medicinas Naturales – Ediciones Frison-Roche (Paris-Francia), 1995
16. Guermonprez M., Pinkas M., Torck M., Matière médicale homeopathique. Doin editores: Paris: 1985
17. Jouanny J., Crapanne JB. Homeopatía, Terapéutica y Materia Médica [CD-ROM]. Francia: Boiron; 1999.
18. Tyler M., Imágenes de los medicamentos Homeopáticos. Primera Edición. B. Jain Publishers. New Delhi (India) 2008
19. Wang L, Bai L, Nagasawa T, Hasegawa T, Yang X, Sakai J, Bai Y, Kataoka T, Oka S, Hirose K, Tomida A, Tsuruo T, Ando M. Bioactive triterpene saponins from the roots of *Phytolacca americana*. J Nat Prod. 2008 Jan;71(1):35-40. Epub 2008 Jan 5
20. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Sep;72(9):3666-70.
21. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol. 2008 Jan;214(2):149-60.
22. Robak T, Gladalska A, Stepień H. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. Eur Cytokine Netw. 1998 Jun;9(2):145-54.
23. Nürnberger W, Platonov A, Stannigel H, Beloborodov VB, Michelmann I, von Kries R, Burdach S, Göbel U. Definition of a new score for severity of generalized *Neisseria meningitidis* infection. Eur J Pediatr. 1995 Nov;154(11):896-900.

24. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):149-60
25. Poitevin B. Las Grandes direcciones de la investigación en Homeopatía. Tratado de Homeopatía. Segunda Edición. Paris (Francia); Ed. Paidotribo; 1995
26. Frenkel M, Mishra BM, Sen S, Yang P, Pawlus A, Vence L, Leblanc A, Cohen L, Banerji P, Banerji P. Cytotoxic effects of ultra-diluted remedies on breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2010 Feb;36(2):395-403
27. Burbano RR, Leal MF, da Costa JB, de Oliveira Bahia M, de Lima PDL, Khayat AS, et al. Lymphocyte proliferation stimulated by activated human macrophages treated with Canova. *Homeopathy.* 2009;98(1):45-8
28. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, Cedergreen N, Cherian MG, Chiueh CC, Clarkson TW, Cook RR, Diamond DM, Doolittle DJ, Dorato MA, Duke SO, Feinendegen L, Gardner DE, Hart RW, Hastings KL, Hayes AW, Hoffmann GR, Ives JA, Jaworowski Z, Johnson TE, Jonas WB, Kaminski NE, Keller JG, Klaunig JE, Knudsen TB, Kozumbo WJ, Lettieri T, Liu SZ, Maiseu A, Maynard KI, Masoro EJ, McClellan RO, Mehendale HM, Mothersill C, Newlin DB, Nigg HN, Oehme FW, Phalen RF, Philbert MA, Rattan SI, Riviere JE, Rodricks J, Sapolsky RM, Scott BR, Seymour C, Sinclair DA, Smith-Sonneborn J, Snow ET, Spear L, Stevenson DE, Thomas Y, Tubiana M, Williams GM, Mattson MP.
Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. (*Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 Jul 1;222(1):122-8. Epub 2007 Mar 7.)
29. Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing Res Rev.* 2008 Jan;7(1):1-7. Epub 2007 Dec 5
30. HAHNEMANN S., Organon de la Medicina, Parágrafo 64, *Encyclopaedia Homeopathica.* Archibel 2006
31. Comisión permanente de los estados unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.* México: D.R. primera edición Instituto Politecnico Nacional Altres Costa-amic; 1998
32. Raut, Narang, Mendiratta, Narang, Deotale. 2008. Evaluation of rapid MTT tube method for detection of drug susceptibility of mycobacterium tuberculosis to rifampicin and isoniazid. *Indian J Med Microbiol* ;26:222-7

33. Kim E, Jeon IS, et al. 2007. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Diseases* 13, 495–499