



**ÍNSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**



ESPECIALIDAD EN TERAPEUTICA HOMEOPÁTICA

Efecto in Vitro del medicamento homeopático Eupatorium Perfoliatum sobre la replicación del virus del dengue cero-tipo 2 en células Vero de Mono

TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN TERAPÉUTICA HOMEOPÁTICA

PRESENTA:

HÉCTOR ELYUD CORTÉS VARGAS

ASESOR: D.en.C JUAN SALAS BENITO

México, D.F. septiembre 2010

INDICE

Página

INDICE DE FIGURAS	3
GLOSARIO	5
RESUMEN	6
MARCO TEÓRICO	8
DEFINICIÓN	8
EPIDEMIOLOGÍA	8
VIRUS DEL DENGUE	9
VECTOR	10
CUADRO CLÍNICO	12
DIAGNÓSTICO	14
TRATAMIENTO	16
PREVENCIÓN	16
MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO	17
ANTECEDENTES	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
DISEÑO	24
MATERIALES Y MÉTODO	25
Virus	25
Células	25
Medicamento	26
RESULTADOS	29
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	34
CONCLUSIONES	37
PERSPECTIVAS	38
BIBLIOGRAFIA	39

INDICE DE FIGURAS

	Página
• Figura 1. Estructura viral del dengue.....	10
• Figura 2. Mosco Aedes aegypti en su fase aérea o de adulto.....	11
• Figura 3. Paciente con síntomas de dengue.....	13
• Figura 4. Paciente con dengue hemorrágico.....	13
• Figura 5. Viabilidad de Células Vero.....	28
• Figura 6. Evaluación de integridad de la monocapa.....	28
• Figura 7. Títulos virales de células Vero infectadas con DEN-2.....	30
• Figura 8. Porcentaje de infección.....	31

INDICE DE ABREVIATURAS

- CH: centesimal Hanemaniana.
- DEN-2: dengue serotipo 2.
- ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
- g: gramos.
- INDRE: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica.
- Ig: Inmunoglobulina.
- *MEM: minimum essential medium* (medio mínimo esencial).
- µg: microgramos.
- µl: microlitro
- ml: mililitro.
- mM: milimol.
- *MOI: Multiplicity of infection* (multiplicidad de infección).
- nm: nanómetro.
- PCR: proteína C reactiva.
- RNA: ácido ribonucleico.
- U: unidades

GLOSARIO

- Célula Vero: Una línea celular derivada del riñón de mono verde africano, (*cercopithecus aethiops*) utilizada principalmente en los estudios de replicación viral y ensayos de placa.
- Citocida: cualquier sustancia que destruye células.
- Dulbecco: es una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.
- Farmacia homeopática: Ciencia que trata de las reglas que han de seguirse en la preparación y conservación de los medicamentos homeopáticos.
- Homeopatía: Del latín *homeo* (semejante), y del griego *pathos* (enfermedad).
- *In vitro*: que se produce en un aparato de laboratorio.
- Número de Avogadro: es la cantidad de entidades elementales átomos, moléculas, iones, electrones, u otras partículas o grupos específicos de éstas existentes en un mol de cualquier sustancia.
- Potencia: División molecular o atomización de los cuerpos medicamentosos, haciéndose más sutil, conforme se eleva en la escala decimal o centesimal.
- Viabilidad: capaz de desarrollarse, crecer o de cualquier otra forma mantener la vida.

RESUMEN

El experimento se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biomedicina Molecular 3 de la Sección de Estudios de Postgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN. Se trabajó con virus del dengue serotipo 2 (DEN-2) para infectar células Vero. Con el fin de evaluar el efecto *per se* del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* sobre las células Vero se llevaron a cabo pruebas de viabilidad por triplicado. Posteriormente se preparó una multiplaca de 24 pozos con células Vero a razón de 1×10^5 células/pozo, las cuales fueron infectadas con el virus DEN-2 a una multiplicidad de infección 0.1. Se incubó la multiplaca por una hora, luego se lavaron las monocapas con medio de cultivo, se añadieron 500 μ l por pozo de medio con los medicamentos homeopáticos a una dilución 1:10. Se dejó proceder la infección por 72 horas para después evaluar los títulos virales mediante el ensayo de placa lítica sobre células BHK-21. Al evaluar el medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* encontramos que no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad de las células Vero. Al analizar los títulos virales en base al porcentaje con respecto a los controles, la potencia 6 CH tuvo un efecto inhibitorio del 17%, la potencia 12 CH del 50% y para la potencia 30 CH existió una infección del 100% mientras que para la 200 CH se observó una replicación del virus muy superior al 100%. Con base en estos resultados el medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* parece no tener, al menos en las condiciones utilizadas, un efecto sobre el proceso de infección del virus del dengue serotipo 2 en las células Vero en las potencias 30 CH y 200 CH.

ABSTRACT

The experiment was performed in the installment of Laboratory 3 of Molecular Biomedicine Section Studies of Master's Degree and Investigation of the National School of Medicine and Homeopathy of the IPN. The study implicated applying of dengue virus serotype 2 (DEN-2) in order to infect *Vero* cells. So as to evaluate the *per se* effect of the homeopathic drug *Eupatorium perfoliatum* onto the *Vero* cells, viability tests by triplicate were carry out, then a rigid clear polystyrene culture plate with 24 flat-bottom wells which contained samples of *Vero* cells was prepared within a proportion of 1×10^5 (cells/flat-bottom well) which were infected with DEN-2 into a 0.1 multiplicity of infection (MOI). The culture plate was incubated for an hour, and then monocapes with culture medium were washed while 500 μ l with homeopathic drugs in 1:10 dissolution were added for each flat-bottom well with culture medium. Finally infection by DEN-2 was allowed for 72 hours so that viral titles could be evaluated by using a lytic plaque assay onto BHK-21 cells. When evaluating the homeopathic drug *Eupatorium perfoliatum* we found that it does not have a significant effect on the viability of *Vero* cells. When analyzing the viral titles on the basis of the percentage with respect to the controls, the 6 potency CH had an inhibiting effect of 17%; the 12 potency CH of 50% and for 30 CH potency an infection of 100% was observed, whereas for the 200 CH potency a replication of the virus was observed far beyond the 100%. On base in these results the homeopathic drug *Eupatorium perfoliatum* seems not to have, at least in the conditions used, a effect on the infection process of dengue virus serotype 2 (DEN-2) in *Vero* cells for 30 CH potency and the 200 CH potency.

MARCO TEÓRICO

DEFINICIÓN

El dengue es ocasionado por un arbovirus siendo el agente causal de una enfermedad caracterizada principalmente por fiebre bifásica, cefalea, dolor retroorbitario, mialgias, artralgias, exantema maculopapular, adenopatías, náusea, vómito, diarrea. Sus complicaciones más graves son el estado de choque y la hemorragia (Chávez, 2002).

EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia a nivel mundial del dengue se ha incrementado drásticamente en las últimas décadas. La enfermedad es endémica en más de 100 países de África, América, el Mediterráneo y el Sureste de Asia. Se estima que anualmente existen 50 millones de casos de dengue en el mundo (Gómez-Dantés, 1991).

En México la presencia del dengue está condicionada por la existencia del vector (mosquito *Aedes aegypti*), quien habita en áreas bien determinadas.

Los estados de la República que tienen menor incidencia de dengue son: Baja California, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Tlaxcala y el DF, mientras que los estados con mayor riesgo son: Sonora, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Veracruz, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Secretaría de Salud, 2008).

Los primeros casos de fiebre hemorrágica por dengue identificados en la República Mexicana se presentaron en San Luis Potosí, situación que prevaleció

durante dos años; sin embargo, la frecuencia de esta enfermedad se ha incrementado tanto en el número de casos como en su extensión territorial a partir de 1990.

Para la semana 32 del 2010 han sido confirmados 9,720 casos de fiebre por dengue y 2520 casos de fiebre hemorrágica por dengue, con un total de 12,240 casos, y 20 defunciones por fiebre hemorrágica por dengue (dgepi.salud.gob.mx, 2010).

VIRUS DEL DENGUE

Este virus es el agente que causa la enfermedad conocida como dengue. Pertenece al grupo de los arbovirus (llamados así porque son transmitidos por artrópodos) y es contagiado al hombre por la picadura de las hembras de mosquitos del género *Aedes*.

Taxonomía del virus del dengue:

Familia ***Flaviviridae***, género ***Flavivirus***, especie ***dengue***.

A esta misma familia pertenecen los virus que causan la fiebre amarilla, la encefalitis de San Luis, la fiebre del Oeste del Nilo y la encefalitis japonesa, entre otras (Leitmeyer, 1999).

Estructura viral

La partícula viral del dengue es de forma esférica y mide entre 40 y 60 nm de diámetro. Tiene una envoltura lipídica, derivada de las membranas de la célula huésped, en la cual se encuentran proteínas (proteína E, principalmente, y proteína M) que cubren completamente la superficie del virus. El material genético se encuentra protegido por una cápside de simetría poliédrica con un diámetro de 25-30 nm. El genoma está compuesto por una sola molécula de RNA de cadena sencilla lineal, de

polaridad positiva, de 10 703 nucleótidos y con regiones de alta variabilidad genómica (Figura 1). Por sí mismos, los ácidos nucleicos genómicos son infecciosos, por lo que las autoridades de salud recomiendan manejar este virus en el nivel de bioseguridad 2 (Leitmeyer, 1999).

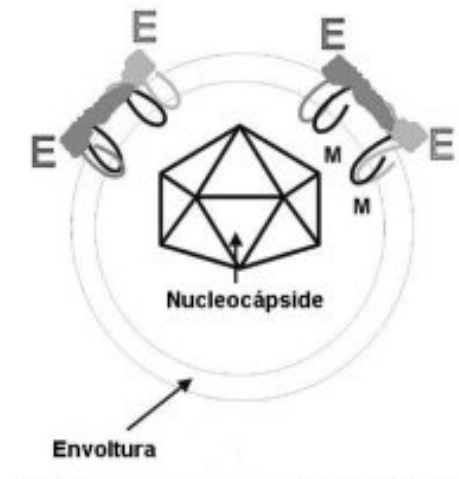


Figura 1. Estructura viral del dengue.

VECTOR

Vector: Se refiere en este caso a un artrópodo que transfiere a un agente de una fuente de infección a un huésped susceptible. Los artrópodos actúan como vectores de enfermedades o como huéspedes intermediarios de patógenos, por ejemplo: virus, bacterias y protozoarios.

El mosquito conocido como *Aedes aegypti* es el responsable de transmitir varias enfermedades como el dengue y la fiebre amarilla, entre otras. Se sugiere que el origen del *Aedes aegypti* es el continente africano y se conocen tres variedades principales: *A. aegypti* var. *aegypti*, *A. aegypti* var. *formosus* y *A. aegypti* var. *queenslandensis*. La variante *aegypti* es la más distribuida en el mundo.



Figura 2. Mosco *Aedes aegypti* fase aérea o de adulto.

A. aegypti, como todos los mosquitos, tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: fase acuática, con tres formas evolutivas diferentes: huevo, larva y pupa; y fase aérea o de adulto o imago (Figura 2).

La fase acuática dura aproximadamente siete días, con rangos entre tres y doce, dependiendo de la temperatura. Los huevecillos soportan la desecación hasta por un año, por eso es muy frecuente encontrar grandes cantidades de larvas en las temporadas de lluvias en diversos recipientes.

El periodo de larva comprende cuatro grados evolutivos denominados primero, segundo, tercero y cuarto. El tiempo aproximado para pasar de un grado a otro es de 48 horas.

El estado de pupa corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática. De ahí emerge el mosquito que corresponde a la fase aérea.

Una vez que los mosquitos han emergido, se alimentan por primera vez entre las 20 y las 72 horas posteriores.

Las hembras de estos vectores son hematófagas, es decir, se alimentan con sangre y es en ese momento cuando transmiten los virus causantes de la enfermedad. Los machos se alimentan de néctares de plantas que se encuentran a sus alrededor; frecuentemente cercanos a las fuentes de alimentación de las hembras para realizar el apareamiento. Están predominantemente asociados al hábitat humano.

La sobrevivencia de los mosquitos depende de la capacidad para alimentarse, reproducirse, protegerse y dispersarse. Generalmente el apareamiento se realiza cuando la hembra busca alimentarse y se ha observado que el ruido que emite al volar es un mecanismo, junto con la participación de otras sustancias liberadas por su cuerpo, para la atracción del macho (Secretaría de Salud, 2008).

CUADRO CLÍNICO

Después de una incubación de 2 a 7 días, el paciente suele experimentar fiebre de comienzo brusco, cefalea, dolor retroorbitario y dolores de espalda además de mialgias intensas que dan lugar a la denominación popular de “fiebre quebrantahuesos”. En el primer día suele haber un exantema maculopapular así como adenopatías, vesículas en el paladar e inyección conjuntival. La enfermedad puede durar una semana y existen habitualmente otros síntomas como anorexia, náuseas o vómito, intensa hipersensibilidad cutánea y cerca de la defervescencia, un exantema maculopapular que comienza en el tronco y se extiende a los miembros y a la cara. En el dengue no complicado se ven a menudo petequias dispersas y las lesiones gastrointestinales previas pueden sangrar durante la fase aguda de la enfermedad (Harrison, 1998).

Fiebre por dengue

Se caracteriza por la presencia de fiebre, la cual es de más de 38 °C y está acompañada por uno o más de los siguientes signos y/o síntomas: dolor de cabeza de predominio frontal, dolor retroorbital, muscular y articular; náusea, vómito, erupción en la piel, fotofobia, enrojecimiento de la faringe, conjuntivitis, dolor abdominal leve, diarrea, alteraciones del gusto, prurito generalizado, insomnio, temor, depresión, así como bradicardia relativa y adenopatías (Figura 3). Dura aproximadamente 5 días,

durante los cuales también está el periodo de transmisión. En niños menores de 5 años es frecuente que sólo se presente la fiebre (Martínez, 1995).



Figura 3. Paciente con síntomas de dengue.

Fiebre hemorrágica por dengue

Puede aparecer precedido de un cuadro de fiebre por dengue. En esta forma también hay fiebre y malestar general. Se pueden presentar hemorragias, que llegan a ser leves o intensas, externas o internas. Los trastornos hematológicos se manifiestan como sangrado debido a alteraciones en la coagulación, observándose epistaxis, gingivorragia, hematemesis, aparición de moretones o enrojecimiento de la piel (Figura 4). En las mujeres puede ocurrir un incremento en la cantidad o duración del periodo menstrual. Las alteraciones en los líquidos corporales se observan en forma de su acumulación en diferentes partes del organismo. Esta presentación del dengue siempre deberá manejarse por un médico y generalmente en área hospitalaria, donde se valora si debe ser ambulatorio u hospitalario (Martínez, *op.cit.*).



Figura 4. Paciente con dengue hemorrágico.

Síndrome de Choque por dengue

Esta es la forma clínica más grave del dengue, necesariamente requiere tratamiento hospitalario ya que el sistema circulatorio del paciente se ve muy comprometido y pone en riesgo la vida.

Como en todo cuadro de choque, hay manifestaciones de insuficiencia circulatoria: piel fría y congestionada, cianosis peribucal o de las extremidades, vómito, llenado capilar lento, taquicardia, tensión arterial disminuida o imperceptible, o bien reducción de la tensión diferencial (sistólica/diastólica) a menos de 20 mm/Hg, pulso rápido y débil o imperceptible y oliguria. Puede haber además inquietud, agitación y alteraciones en el estado de conciencia, como letargo o confusión. Se han identificado los siguientes signos de alarma que hacen inminente el cuadro de choque en un paciente con fiebre hemorrágica por dengue, permitiendo un manejo oportuno: dolor abdominal intenso y sostenido que pasa a ser uno de los componentes sintomáticos del cuadro al dato cardinal; vómito persistente, caída brusca de la temperatura, de hipertermia a hipotermia, con frecuencia acompañada de sudoración, adinamia, lipotimias, inquietud o somnolencia (*Martínez, citado*).

DIAGNÓSTICO

Después de la inoculación por la picadura del mosquito, el virus del dengue infecta células periféricas mononucleares. La mayor probabilidad de aislamiento se da antes del quinto día después del inicio de los síntomas. Después de este periodo empiezan a incrementarse los títulos de anticuerpos IgM que interfieren con el aislamiento viral. En el caso de infección por virus del dengue, el título de IgM se incrementa lentamente y generalmente es específico de serotipo. En algunos pacientes, todavía con fiebre, ya se pueden detectar anticuerpos IgM. Hasta el 80% de los pacientes puede tener IgM detectables cinco días después del inicio de los síntomas y hasta el 90% puede tenerlos a los 10 días. El pico máximo generalmente se observa a

los 15 días del inicio de los síntomas y decae a niveles no detectables en los dos o tres meses subsecuentes (Guzmán, 2008).

En una primoinfección hay una respuesta inmune primaria en donde los títulos de IgM empiezan a ser detectables a partir del quinto día después de iniciar la sintomatología. Los títulos de IgG se empiezan a elevar a partir de la segunda semana de iniciada la infección. En una infección secundaria los títulos de IgG se elevan más aún en la fase aguda y los anticuerpos IgM declinan rápidamente (Gubler, 2003).

En la identificación de material genético por RT-PCR se requiere suero de los primeros cinco días de iniciada la fiebre o biopsia de hígado, bazo y ganglios. Si el resultado es positivo, indica la presencia de material genético viral, por lo que se considera una infección reciente. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección y es necesario tomar una segunda muestra para la determinación de anticuerpos IgG.

La determinación de anticuerpos IgG específicos por ELISA requiere de una muestra de suero en cualquier momento de iniciada la fiebre. Un resultado positivo indica una infección reciente o pasada y si es negativa a dengue se necesita investigar otros padecimientos. Para la prueba de determinación de anticuerpos IgG específicos por inhibición de la hemoaglutinación requiere de muestras de suero pareadas: una tomada en la fase aguda y otra en la fase de convalecencia (dos semanas después) de iniciada la fiebre. Una interpretación positiva indica una infección reciente cuando hay seroconversión o el título de anticuerpos se incrementa cuatro veces o más entre la primera y la segunda muestra. Indica una infección pasada cuando no hay seroconversión o el título de anticuerpos se mantiene igual entre la primera y la segunda. (Secretaría de Salud, 2008).

TRATAMIENTO

No hay un medicamento específico para tratar la infección por el virus del dengue. La base del tratamiento para esta enfermedad es la terapia de apoyo. El aumento de la ingesta de líquidos orales se recomienda para prevenir la deshidratación. Para aliviar el dolor y la fiebre, los pacientes deben tomar paracetamol-MR (acetaminofén). La suplementación con líquidos intravenosos puede llegar a ser necesaria para prevenir la deshidratación y compensar la hemoconcentración si el paciente es incapaz de mantener la ingesta oral.

A pesar de no existir tratamiento específico se están realizando estudios de medicamentos retrovirales que puedan ayudar en la inhibición y replicación del virus donde la rimantadina, la ribavirina y la ribavirina-tricetico han sido evaluados de forma eficaz *in vitro* en modelos experimentales (Wayne, 1983).

La amantadina también ha demostrado un efecto inhibitorio significativo sobre la replicación de este virus *in vitro* lo que hace relevante el conocer sus efectos *in vivo* (Wayne, 1980).

También se ha examinado la acción del ácido micofenólico en células infectadas con el serotipo 2 y se ha encontrado un efecto inhibitorio *in vitro* evaluado por los niveles de viriones producidos y la replicación viral intracelular (Ratree, 2006).

PREVENCIÓN

La vigilancia entomológica contempla los estudios que se deben de efectuar sistemáticamente a los vectores del dengue en su fase larvaria en las localidades consideradas de riesgo. Se considera control larvario a todas aquellas actividades realizadas por métodos físicos, químicos y biológicos dirigidas a la eliminación o control

de cualquier depósito donde se desarrollan o puedan desarrollarse las larvas de cualquier tipo de mosquito, especialmente del *A. aegypti*. El control físico consiste en colocar una barrera física, de forma temporal o definitiva, entre el mosquito transmisor del dengue y los recipientes contenedores de agua. Estas actividades incluyen el control de recipientes al lavar, tallar, voltear, destruir, cubrir, proteger bajo techo o evitar el almacenamiento de agua en todos los recipientes que permitan la cría de larvas de mosquitos. El control químico proporciona mayor rendimiento e impacto contra los mosquitos en sus etapas larvarias, utilizando productos químicos con efecto larvicida. Se utilizará única y exclusivamente en los depósitos y recipientes en los que no se puede realizar el control físico. El control biológico es comúnmente empleado en algunos lugares del país e involucra la utilización de modelos ecológicos depredador-presa, que reducen las poblaciones larvales; tal es el caso de los peces que se mantienen en los contenedores de agua. La promoción es un componente importante y no hay que dejar pasar la oportunidad para informar y crear conciencia acerca de los riesgos que contrae la enfermedad dentro de la población susceptible (Secretaría de Salud, 2008).

MEDICAMENTO HOMEOPÁTICO

Eupatorium perfoliatum

Familia botánica: Compuestas o Asteráceas

Nombre común: Hierba de la fiebre, Hucha de San Cunegundo, Orégano de los pantanos.

Hábitat: Norteamérica desde Nueva Escocia y Dakota hasta Florida y Louisiana, Francia. Lugares húmedos y pantanosos (Higuera, 1997).

Su principio activo: es un glucósido llamado eupatorina.

Usos en medicina tradicional: Ha sido empleada en medicina popular como antihelmíntico y a grandes dosis como emético y laxante (López, 1990). Es reputada como tónico, sudorífica y diurética (Sandoval, 2004).

Patogenesis:

Sensación de quebrantamiento y laxitud generalizada con dolores intensos en los huesos, como si éstos estuvieran rotos.

Agravación por el movimiento el aire libre, por descubrirse y por beber. Mejora por el reposo, el calor y por estarse en casa.

Dolores óseos agudos y violentos que se agravan por el menor movimiento y que mejoran por el reposo. Sensación de quebrantamiento y de laxitud generalizada con rigidez, lumbago intenso y dolores articulares y musculares, sobre todo a nivel de pantorrillas (Vannier, 2004).

Dolor de quebrantamiento en los huesos; fiebre sed y agravación general por el movimiento; estos enfriamientos corresponden algunas veces a *Eupatorium perfoliatum* y algunas veces a Bryonia que son muy semejantes entre sí, pero el dolor de huesos está más marcado en *Eupatorium perfoliatum* (Kent, 1923).

A *Eupatorium perfoliatum* se le dio el nombre popular de “compone huesos” debido a que en una epidemia de fiebre intermitente, en la que los enfermos presentaban intensos dolores, como si los huesos estuvieran rotos, éste fue el remedio que los curó. A esta afección epidémica se la llamó fiebre rompe huesos, que es uno de los nombres que recibe el dengue (Nash, 1979).

En la materia médica homeopática se presentan otros síntomas también relacionados con la enfermedad del dengue como son el intenso dolorimiento de los globos oculares con dolores óseos periorbitarios, como golpeados o magullados. Bordes de los párpados rojos, con secreción glutinosa. Cara enfermiza, cetrina, de color rojo- oscuro (durante la fiebre) o con mejillas rojas y piel seca, pálida y estirada. Hígado crecido y subictericia (Vijnovsky, 1997).

Tos seca que se agrava estando acostado sobre la espalda y mejora colocándose de rodillas en la cama con la cabeza en la almohada. Tos con dolores intercostales que empeoran con la inspiración profunda pero se calman por la presión fuerte. Fiebre que aparece de las 7 a las 9 de la mañana. Escalofríos con sed intensa. Lasitud generalizada y dolores óseos profundos (Vannier, 2004).

Sed intensa mucho antes de aparecer el escalofrío y continua durante éste y la fiebre pero cesa cuando suda; sed de agua fría; toma un sorbito o mucho cada vez, es una sed insaciable. Sed antes de vomitar y durante el escalofrío. Vómitos antes, durante y después del escalofrío, durante la fiebre y la transpiración. Vómitos biliosos antes, durante y después del escalofrío y durante la fiebre (Vijnovsky, 1997).

La característica de este remedio es la escasez de sudor. Presenta en ocasiones tristeza y melancolía (Kent, 1923).

ANTECEDENTES

Dentro de los trabajos realizados en relación al dengue y la homeopatía, encontramos que en Brasil se presentan 5000 casos anualmente por lo que han surgido varias iniciativas de instituciones homeopáticas para trabajar en el combate a esta enfermedad. Éstas elaboraron un documento oficial para ser aprobado. Se redactó un protocolo para el abordaje del dengue con la finalidad de mostrarlo al ministerio de salud relacionando medicamentos, desde el punto de vista fisiológico, con la homeopatía. Este trabajo se elaboró a partir de protocolos de entidades homeopáticas que atendieron casos de dengue por dos años. Fue ampliamente discutido por las autoras y colaboradores y se presentó al Congreso. Actualmente está en discusión (Walcymer, 2002).

Investigaciones realizadas en la Universidad de Buenos Aires Argentina con las sustancias derivadas de diversas plantas han demostrado el efecto antiviral de algunas de ellas. Los extractos de 3 especies de Eupatorium del sur de América: *E. buniifolium*, *E. articulatum* y *E. glutinosum* tuvieron efectos antivirales *in vitro* sobre los virus del herpes-2 y dengue, lo cual representa un soporte importante para el uso de plantas medicinales en el tratamiento de infecciones virales (García, 2002).

En México, en la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía la doctora López Gutiérrez efectuó un estudio donde se infectaron células C6/36 (línea celular derivada del mosquito *Aedes albopictus*) a las cuales se las trató con el medicamento homeopático *Phosphorus* a las potencias 6, 12, 30 centesimales, para ver los posibles cambios en la producción viral. Debido a que los pozos tratados con medicamento homeopático mostraron deterioro marcado de la monocapa celular, se decidió llevar a cabo un experimento de viabilidad con el medicamento homeopático *Phosphorus* en las mismas potencias utilizadas en el experimento con el virus DEN-2, obteniendo como

resultado que la viabilidad correspondía únicamente a un 30.6% en las células tratadas con vehículo, a un 7.23% en las que fueron tratadas con medicamento homeopático a la 6CH, y 0% de viabilidad celular a partir de la potencia 12 CH. Además el número celular decreció a medida que aumentaba la potencia del medicamento. Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que el efecto antiviral del *Phosphorus* a sus diversas potencias se debe más a un efecto citocida sobre la células C6/36 que a uno específico sobre el virus (López, 2005).

En un segundo trabajo, llevado a cabo también en la misma Escuela, se buscó evaluar el efecto del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* a las potencias 6, 8, 12 y 30 CH en el proceso general de infección del virus DEN-2, a la línea celular C6/36. Fue necesario primero valorar las repercusiones del medicamento sobre la viabilidad de las células C6/36. Una vez estandarizados los ensayos de viabilidad, no obteniendo ningún efecto citotóxico sobre las células, se procedió a realizar la infección. Al analizar los títulos virales se observó que ninguna de las potencias de *Eupatorium perfoliatum* probadas tuvo efecto significativo sobre la replicación del virus; solamente las tratadas con la potencia 12 CH tuvieron un ligero efecto inhibitorio comparadas con el control (Zavala, 2007).

JUSTIFICACIÓN

La presencia o ausencia de la enfermedad producida por el virus del dengue depende de la co-existencia simultánea en una misma zona geográfica del mosquito transmisor, el virus y la población susceptible. Por esta razón la frecuencia de esta enfermedad se incrementa en número de casos y en extensión territorial.

No existe un tratamiento antiviral específico contra el dengue ni hay vacunas para prevenir su infección. Además se carece de estudios suficientes que comprueben la eficacia del medicamento homeopático *in vitro*. Es necesario, además desarrollar un medicamento de bajo costo que esté al alcance de la población susceptible por lo que es importante continuar realizando ensayos con medicamentos homeopáticos para valorar su efecto sobre la infección viral en líneas celulares con la finalidad de, en un futuro, poderlas aplicar en los pacientes afectados por el virus del dengue.

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes previos obtenidos con el uso de extractos de plantas del género *Eupatorium* sobre el virus del dengue, se espera que habrá una disminución de la replicación viral, con la administración de *Eupatorium perfoliatum*, en las células Vero infectadas con el virus dengue, serotipo 2.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* sobre células Vero infectadas con el virus del dengue, serotipo 2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar las condiciones de cultivo para las células Vero.

Analizar el efecto del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* en la viabilidad de la línea celular Vero.

Analizar el efecto del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum*, sobre los títulos virales en células Vero infectadas con virus del dengue 2.

DISEÑO

El trabajo es de tipo:

Experimental

Transversal

Analítico

Directo

Lugar: Laboratorio de biomedicina molecular 3 de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.

MATERIALES Y MÉTODO

El experimento se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biomedicina Molecular 3 de la Sección de Estudios de Postgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN.

Virus

Para la realización de los experimentos se empleó el virus de dengue, serotipo 2 (DEN-2) donado por el INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica) y previamente propagado, por inoculación intracerebral, en ratones recién nacidos Balb/c y almacenado a -70° C.

Células

En este estudio, las células Vero de Mono Verde fueron cultivadas en frascos de 75 cm² (NUNC) utilizando medio de cultivo Dulbecco con alta concentración de glucosa (GIBCO BRL) suplementado con HEPES (5.9 g/litro), bicarbonato de sodio (0.037 g/100 ml), 10% de suero fetal bovino, piruvato de sodio 2 mM y penicilina (100 U/ml) — estreptomina (100 µg/ml). Se incubaron a 37° C en cámara húmeda a una concentración de 5% de CO₂ (Incubadora marca LABLINE).

Para la realización del plaqueo se utilizaron células BHK-21 las cuales fueron cultivadas en cajas de petri de vidrio con medio MEM suplementado con NaHCO₃ (0.034 g/100 ml), suero fetal bovino al 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml) y tilosina (0.024 µg/ml). Las células se mantuvieron a 37° C en cámara húmeda a 5% de CO₂.

Medicamento

El medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* (Laboratorio Cortés), a las potencias 6CH, 12CH, 30CH y 200CH en solución en agua bidestilada, fue proporcionado por el Dr. Gonzalo Cortés, médico docente de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía con amplia experiencia en la preparación de medicamentos homeopáticos. Aunque la mayoría de farmacopeas homeopáticas describe la preparación de los medicamentos en soluciones con partes de alcohol y agua o únicamente en alcohol puro, en el presente experimento se decidió utilizar el agua bidestilada como vehículo de los medicamentos homeopáticos teniendo en consideración que el alcohol por sí mismo podría causar un efecto deletéreo en la viabilidad celular. Todos los medicamentos fueron filtrados en condiciones de esterilidad mediante filtros Millipore de 0.22 μm antes de realizar los experimentos.

Pruebas de viabilidad con medicamentos homeopáticos en células Vero.

Para evaluar el efecto sobre la viabilidad de las células Vero del medicamento homeopático se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se sembraron las células Vero en una multiplaca de 24 pozos a razón de: 1 x 10⁵ células por pozo y se incubó durante 24 horas a 37° C en la incubadora.

Al segundo día se realizó la preparación del medicamento homeopático:

Previa rotulación de 6 tubos cónicos estériles se realizaron las siguientes mezclas. Se agregaron 2250 μl de medio de cultivo y 250 μl de medicamento homeopático para lograr una dilución 1:10. En un caso el medicamento fue sustituido por el vehículo (agua bidestilada) como control. Se aspiró el medio de cultivo de la multiplaca y se lavaron las células con 1 ml de medio fresco por pozo. Se agregaron 0.5 ml por pozo del medicamento homeopático previamente diluido en medio de cultivo

(potencias 6 CH, 12 CH, 30 CH, 200 CH), del vehículo diluido o de medio de cultivo de tal forma que cada línea de la multiplaca fue equivalente a un tratamiento y cada tratamiento estuvo conformado por 4 pozos. La multiplaca fue incubada nuevamente a 37° C.

Después de 72 horas, se removió el medio de exclusivamente los 3 primeros pozos de cada línea. La cuarta línea se dejó para valorar la integridad de las monocapas.

Se agregaron 500 µl de amortiguador de despegado (Tris-HCl 40mM, EDTA 1mM, NaCl 15mM) por pozo y posteriormente las células fueron desprendidas mediante un gendarme (uno por cada pozo). Las células fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1.5ml adecuadamente rotulados.

Se hizo una dilución 1:10 con azul de Tripano (GIBCO) (5 µl de células y 45 µl de azul tripano).

Finalmente las células se contaron en una cámara de Neubauer para valorar viabilidad.

Infección con virus DEN-2

Se preparó una multiplaca de 24 pozos con células Vero a razón de 1×10^5 células/pozo, como se describió anteriormente y se incubó a 37° C por 24 horas.

Para preparar el inóculo viral se agregaron 3,086 µl de medio de cultivo y 1,713 µl de extracto de cerebro de ratón recién nacido infectado con el virus DEN-2. Se lavaron las monocapas celulares con 1 ml de medio por pozo y posteriormente se agregar 200 µl del inóculo viral preparado (multiplicidad de infección (MOI) de 0.1).

Se incubó la multiplaca a 37° con agitación suave por una hora. Se lavaron las monocapas con medio de cultivo como se indicó anteriormente y se añadieron 500 µl por pozo de medio con los medicamentos homeopáticos, vehículo o medio fresco. Se dejó proceder la infección por 2 días, al final de los cuales se tomaron 3 alícuotas por pozo del medio de cultivo, de 100 µl c/u, las cuales se almacenaron a -70° C para posteriormente evaluar los títulos virales. Este ensayo se realizó por triplicado.

Plaqueo de dengue en células BHK-21:

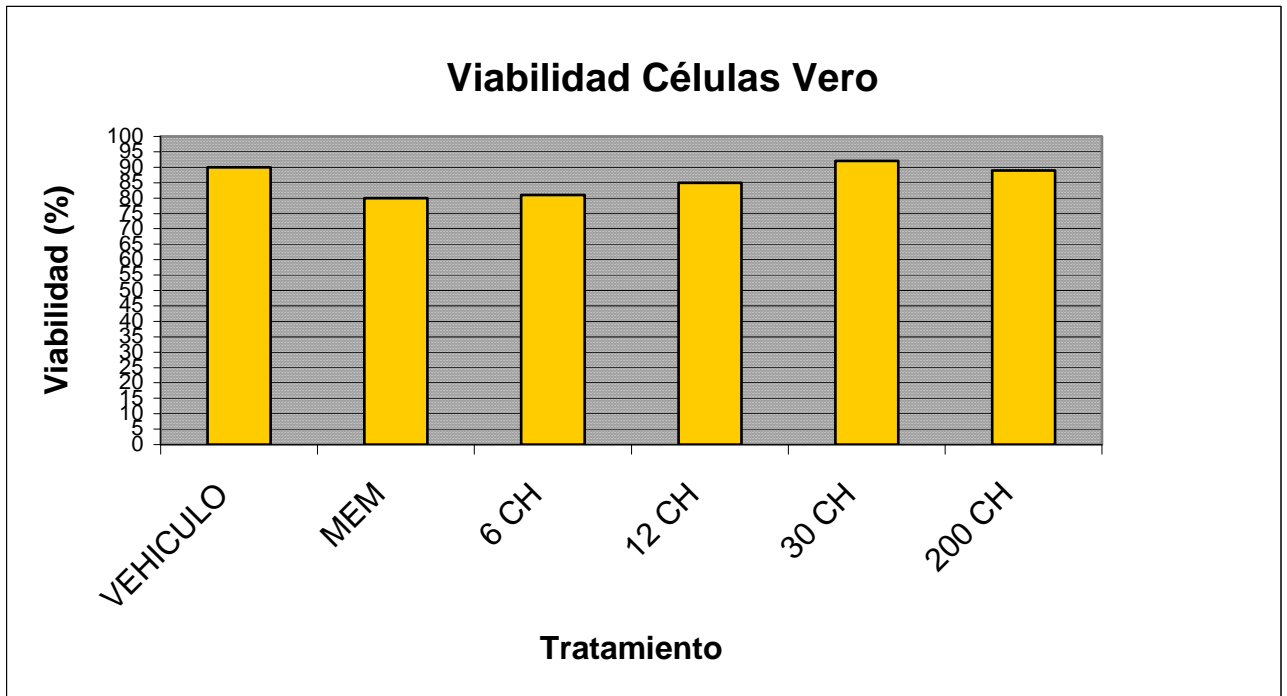
Para el plaqueo se emplearon células BHK-21 a razón de 2.5×10^5 células por pozo en una multiplaca de 24 pozos con un volumen de 500µl de medio de cultivo y se incubó por una hora a 37°C para permitir la adhesión de las células. Se preparó 1 ml de cada dilución viral (10^{-1} a 10^{-5}) usando como diluyente solución de Hanks-SFB (KCl 5.4 mM, NaH_2PO_4 0.3 mM, KH_2PO_4 0.4 mM, NaHCO_3 4.2 mM, CaCl_2 1.3 mM, MgSO_4 0.6 mM, NaCl 123 mM, D-glucosa 5.6 mM, antibióticos 1x, suero fetal bovino 0.5%) el cual se esterilizó por filtración en condiciones asépticas. Posteriormente se incubaron las diluciones virales a 37°C por una hora para posteriormente agregar 50 µl/pozo de cada dilución a cada uno de los pozos de la multiplaca. Se incubaron las células con el virus a 37°C por 4 horas y se añadieron 0.5 ml/pozo de carboximetilcelulosa al 3% (CMC) (SIGMA) previamente esterilizada por autoclave. Las multiplacas se incubaron nuevamente por 5 días a 37° C en la incubadora con una concentración del 5% de CO_2 .

Posteriormente se eliminó el medio de cultivo de cada pozo, las monocapas se lavaron con 1 ml de PBS (NaH_2PO_4 0.11g, Na_2HPO_4 0.57g, NaCl 4.5 g para 500 ml) pH 7.95 esterilizado por autoclave y se tiñeron con solución 0.5 ml de Naftol Blue Black (Naftol Blue Black 0.1%, Acetato de sodio 13.6g, Ácido acético glacial 6% para 1000ml) durante 10 minutos a 37°C. Finalmente se lavó con agua y se contaron las placas.

RESULTADOS

Viabilidad con medicamentos Homeopáticos células Vero.

Con el fin de evaluar el efecto *per se* del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* sobre las células Vero, se llevaron a cabo pruebas de viabilidad por triplicado, para lo cual una multiplaca de 24 pozos con 1×10^5 células Vero por pozo fue tratada por 72 horas con el medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* a las diferentes potencias diluidas 1:10 en medio de cultivo. Como controles se emplearon células tratadas con vehículo (agua bidestilada) o con medio de cultivo. Después de 72 horas se realizó la observación al microscopio para ver la morfología celular y detectar algún efecto deletéreo en aquellas a las que se les había administrado el medicamento homeopático. Posteriormente la viabilidad celular fue evaluada con la técnica de exclusión por azul tripano donde se observó una viabilidad del 81% para la potencia 6 CH, 85% para la potencia 12 CH, 92% para la 30 CH, 89% para la 200 CH, 90% para el vehículo y 80% para el medio de cultivo (Figura 5). Con la finalidad de completar esta evaluación, las monocapas celulares fueron teñidas con cristal violeta y la integridad de la monocapa fue evaluada a simple vista. Se observó una mejor integridad de la monocapa en las células tratadas con el vehículo y el medio de cultivo, mientras que en las tratadas con los medicamentos homeopáticos fue ligeramente menor (Figura 6).



*VEHICULO: en la primera barra el medicamento fue sustituido por agua bidestilada como testigo control.

*MEM: en la segunda barra solo se coloco medio de cultivo como control.

Figura 5. Gráfico donde se observan los resultados de la evaluación de la viabilidad celular de las células Vero tratadas con las diferentes potencias de medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* por 72 h.

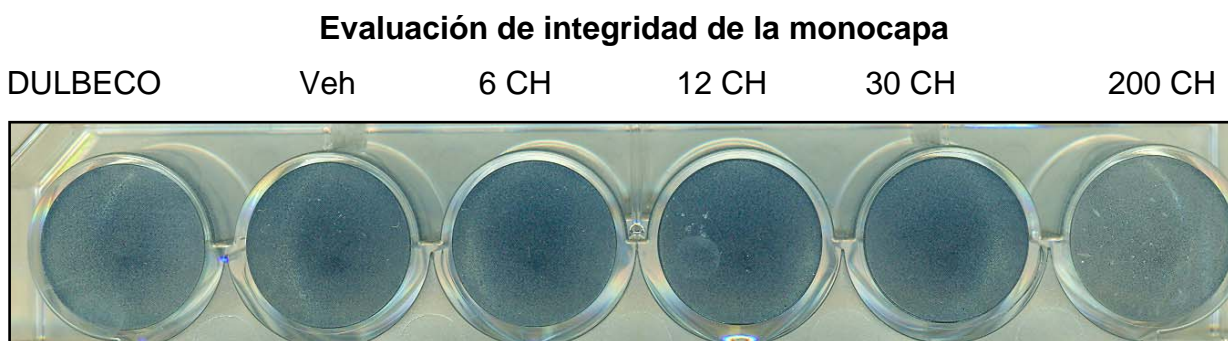


Figura 6. Multiplaca de 24 pozos con células Vero teñidas con cristal violeta después de 3 días de haber sido incubadas con medio de cultivo y las diferentes potencias de *Eupatorium perfoliatum*.

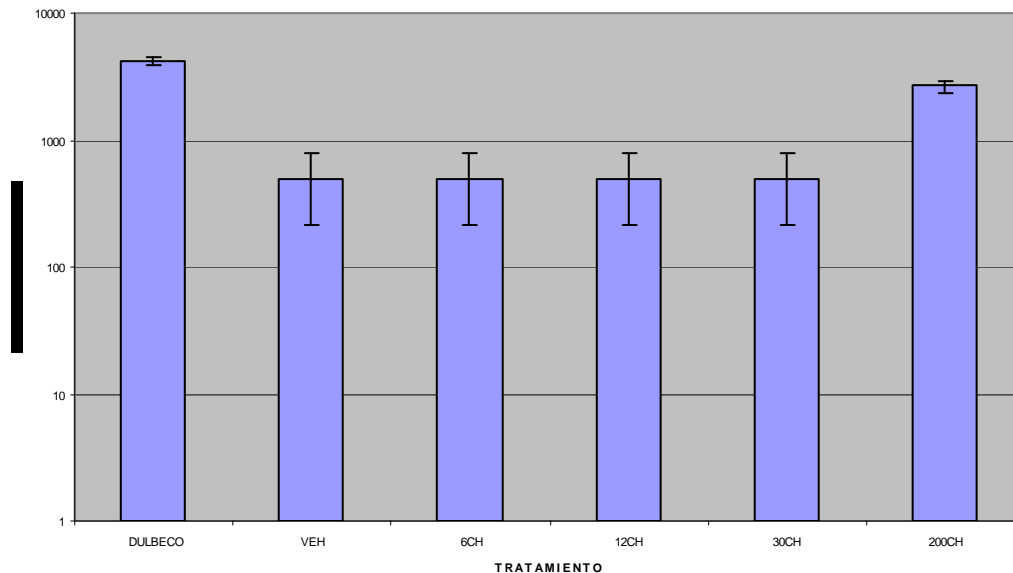
Los resultados anteriores sugieren fuertemente que el medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* no tiene un importante efecto citocida sobre las células Vero bajo las condiciones utilizadas.

Ensayo de placa lítica

Una vez que los resultados sobre la viabilidad celular fueron favorables, se procedió a evaluar el efecto del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* a sus diferentes potencias en la infección por el virus del dengue. Para ello procedimos a realizar la infección con DEN-2, previamente propagado por pases en cerebro de ratón lactante. En una multiplaca de 24 fueron sembradas células Vero bajo las condiciones previamente descritas y posteriormente se agregaron 200 µl de inóculo del virus DEN-2 con una multiplicidad de infección 0.1. Se incubó la multiplaca a 37° con agitación suave por una hora. Posteriormente se lavaron las monocapas con medio de cultivo, se añadieron 500 µl por pozo de medio con los medicamentos homeopáticos diluidos 1:10, vehículo o medio fresco. Se dejó proceder la infección por 72 horas al final de los cuales se tomaron 3 alícuotas del medio de cultivo, de 100 µl c/u por pozo, las cuales se almacenaron a -70° C para posteriormente evaluar los títulos virales. Estos se midieron mediante el ensayo de placa lítica sobre células BHK-21 en una multiplaca de 24 pozos. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los valores se expresaron como un promedio de los 3 experimentos +/- la desviación estándar.

Al analizar el efecto de las distintas potencias del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* sobre los títulos virales se puede apreciar que ninguna tuvo algún efecto inhibitorio que superara un logaritmo de diferencia (Figura 7).

Títulos virales de células Vero infectadas con DEN-2



*DULBECO: medio de cultivo, es una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

*VEH: Vehículo utilizado como testigo control.

Figura 7. Títulos virales de células Vero infectadas con DEN-2 bajo el efecto de *Eupatorium perfoliatum*. Las células Vero fueron infectadas con DEN-2 y tratadas con distintas potencias de *Eupatorium perfoliatum*. Los títulos virales de los sobrenadantes fueron evaluados mediante ensayo de placa lítica en células BHK-21. Se muestran los promedios de 3 experimentos +/- la desviación estándar.

Al analizar los títulos virales en porcentajes, tomando como 100% los títulos virales obtenidos en las células no tratadas (medio Dulbeco), observamos un nivel de infección del 50% en la potencia 12 CH y del 80% para la 6 CH, no así para ninguna de las otras potencias. En la potencia 30 la infección fue del 100% y para la potencia 200 fue superior al 500% (Figura 8).

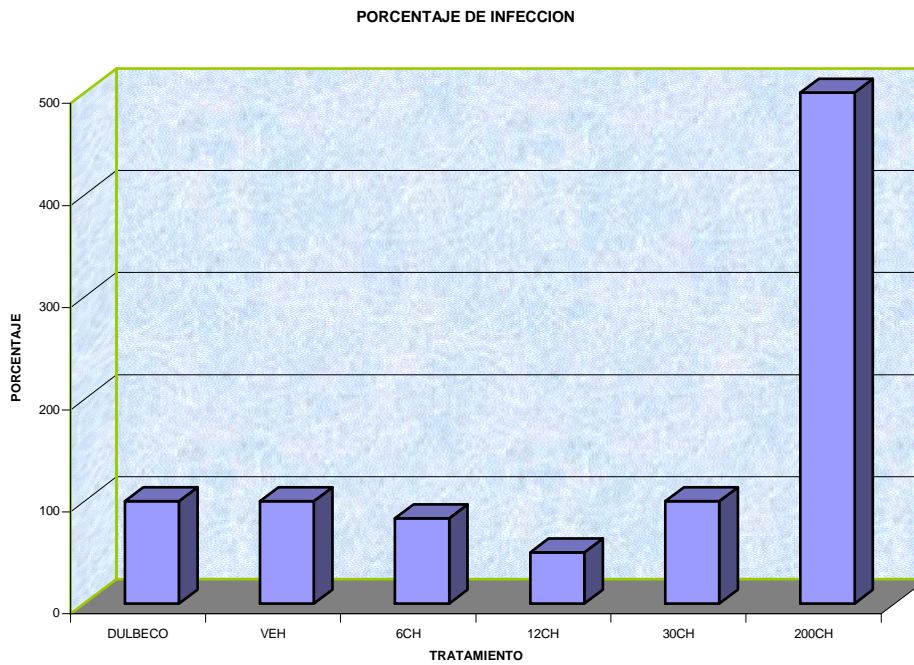


Figura 8. Títulos virales de células Vero infectadas con DV-2 y tratadas con el medicamento *Eupatorium perfoliatum*. Las células fueron infectadas con DV-2 y tratadas con medicamento *Eupatorium perfoliatum*. Los títulos virales de los sobrenadantes fueron evaluados mediante ensayo de placa lítica en células BHK-21. La gráfica que muestra los promedios de 3 experimentos.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para la Escuela de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, este estudio forma parte fundamental dentro de los trabajos realizados con medicamentos homeopáticos y el virus del dengue serotipo 2, debido a que este constituye el tercer trabajo de este tipo dando soporte a las anteriores investigaciones en las que se utilizaron también medicamentos homeopáticos. En el primer trabajo se observó un efecto citocida sobre las células C6/36 por parte del medicamento *Phosphorus* y en el segundo experimento se decidió utilizar el mismo tipo de células pero el medicamento *Eupatorium perfoliatum* donde, aunque no hubo un efecto deletéreo sobre la línea celular, tampoco lo hubo sobre la replicación viral.

Al evaluar el efecto del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* sobre las células Vero, encontramos que la viabilidad osciló entre un 92%, cuando se usó la potencia 30 CH del medicamento, hasta un 80-90% cuando se emplearon el vehículo o el medio de cultivo sugiriendo que, en las condiciones utilizadas, el medicamento homeopático no ejerce un efecto citocida o deletéreo para las células. De entre los distintos tratamientos, la potencia 30 CH fue la que mejor viabilidad presentó. Aunque en experimentos previos donde se trabajó también con el medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* hubo un porcentaje de viabilidad más bajo con la potencia 30 CH, quizá esto fue debido a que las células empleadas fueron de artrópodo y no de mamífero (Zavala, 2007).

A pesar de que las viabilidades en las células tratadas con las potencias 6 CH y 12 CH fueron menores, no se puede concluir que esto sea debido a que sobrepasan el número de Avogadro, ya que el control donde se usó el medio de cultivo presentó una viabilidad del 80%.

Para la determinación del efecto del medicamento sobre la producción de la progenie viral, procedimos a la infección de las células Vero con el DEN-2 por 2 días en presencia de las distintas potencias de *Eupatorium perfoliatum*, al final de los cuales se tomaron 3 alícuotas del medio de cultivo, de 100 µl c/u por pozo, las cuales se almacenaron a -70° C para posteriormente evaluar los títulos virales mediante el ensayo de placa lítica en células BHK-21. No se observó un efecto inhibitorio significativo con ninguna de las potencias del medicamento homeopático, sin embargo, al analizar los títulos virales en base al porcentaje con respecto a los controles, la potencia 6 CH tuvo un efecto inhibitorio del 17%, la potencia 12 CH del 50% y para la potencia 30 CH existió una infección del 100% mientras que para la 200 CH se observó una producción de virus muy superior al 100%.

En el experimento previamente realizado con células de artrópodo (Zavala 2007), también infectadas con el DEN-2 y tratadas con medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* se observó un efecto inhibitorio del virus de hasta el 65% con la potencia 12 CH respecto a los controles. En las células de mamífero infectadas con el mismo virus nosotros encontramos un efecto de inhibición del 50%. En este caso es interesante notar que a pesar de estar utilizando diferentes tipos de células, encontramos un efecto semejante cuando se empleó la potencia 12 CH de *Eupatorium perfoliatum* lo que no hace pensar que esto es debido probablemente a la actividad molecular que existe ya que en esta potencia homeopática sabemos que no se sobrepasa la ley de Avogadro en la que todavía encontramos moléculas. Quizá en potencias mas altas pudiéramos pensar que no existió ningún efecto debido a la carencia de actividad molecular.

Estudios previos realizados en Argentina con extracto de aceite liofilizado de *Eupatorium patens* mostraron un efecto antiviral *in vitro* sobre el virus del dengue virus tipo 2. El virus fue tratado directamente con los extractos de la planta y posteriormente se evaluó la capacidad infectiva sobre células Vero (García, 2002). En nuestro trabajo las células Vero fueron tratadas con las distintas potencias homeopáticas

inmediatamente después de la infección por lo que el tipo de evaluación de efecto antiviral no es totalmente equiparable entre los dos trabajos. Por otra parte, (García y col., 2002) utilizaron el extracto de las flores y frutos, en forma de aceite liofilizado, para la realización de su estudio, en lugar de preparaciones homeopáticas. Se requerirá de realizar más estudios y probablemente otro tipo de preparaciones para evaluar el efecto antiviral que pudiera tener *Eupatorium perfoliatum*.

CONCLUSIONES

El medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* a las potencias 6 CH, 12 CH, 30 CH y 200 CH, no tiene un efecto deletéreo significativo sobre la viabilidad de las células Vero.

El presente estudio demostró que las distintas potencias empleadas del *Eupatorium perfoliatum* no tienen un efecto significativo sobre el proceso de infección del virus del dengue serotipo 2 en las células Vero bajo las condiciones utilizadas.

Al analizar el efecto inhibitorio del medicamento homeopático *Eupatorium perfoliatum* en base al porcentaje y con respecto a los controles, el efecto inhibitorio más significativo sobre virus fue la potencia 12 CH, comparado con las otras diluciones.

PERSPECTIVAS

A pesar de los resultados obtenidos en este trabajo, los medicamentos homeopáticos han sido utilizados en cuadros clínicos de infecciones por virus del dengue, lo que hace necesario la realización de más investigación básica para conocer el efecto de los medicamentos homeopáticos sobre la replicación del virus del dengue.

La experimentación con otras especies del género de *Eupatorium* es necesaria para valorar sus efectos así mismo, se deberá ampliar los estudios utilizando otros medicamentos homeopáticos del reino mineral y animal.

Realizar estudios aplicando directamente los medicamentos homeopáticos sobre el virus, así como emplear otras especies de células. Utilizar medicamentos homeopáticos sobre otros virus.

BIBLIOGRAFIA

1. Chávez Tapia N., Lizardi Cervera J. DENGUE, Revisiones Médica Sur; México 2002, Vol.9, núm.3. pp. 135-137.
2. Garcia C. C., Talarico L. VIRUCIDAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM AROMATIC PLANTS OF SAN LUIS, ARGENTINA, Phytother. Res. 2002; 17; pp. 1073-1075.
3. Gómez-Dantés H. EL DENGUE EN LAS AMERICAS. UN PROBLEMA DE SALUD REGIONAL; Salud Pública de México 1991; 33; pp. 347-355.
4. Gubler D.J., Kuno G. DIAGNOSIS OF DENGUE VIRUS INFECTION BY DETECTION OF SPECIFIC IMMUNOGLOBULIN M (IGM) AND IGA ANTIBODIES IN SERUM AND SALIVA, Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10: pp. 317-322.
5. Guzmán M.G., Kouri P.G. DENGUE DESAFIO QUE CONTINUA. Rev. Fac. Med. Unal. 2008; 56: pp. 87-89.
6. Higuera Ramírez F.J. FARMACOPEA HOMEOPATICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. Ejemplar número 0801; México 1997; pp. 115.
7. Harrison. T.R., PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. Vol. 1; Ed. McGraw-Hill; México 1998; pp. 1301-1311.

8. Kent J.T., MATERIA MEDICA HOMEOPATICA Vol.1. Editor F. Olmedo; México 1923; pp. 407-410.
9. Leitmeyer K.C., Vaughn D.N., Watts D.M., DENGUE VIRUS STRUCTURAL DIFFERENCES THAT CORRELATE WITH PATHOGENESIS. J Virol. 1999; 73; pp. 1-10.
10. López Gutiérrez K. TESINA: EFECTO IN VITRO DEL MEDICAMENTO HOMEOPATICO PHOSPHORUS SOBRE LA REPLICACION DEL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 2 EN CELULAS C6/36; Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía; México DF, 2005; pp. 30-48.
11. López Flores R. EVALUACION DE LA ACCION DE EUPATORIUM PERFOLIATUM EN EL TRATAMIENTO DE TRIQUINOSIS EN RATAS. Temas de Investigación en Homeopatía. Propulsora de Homeopatia, S.A. México 1990; pp. 79-88.
12. Martínez Torres E. DENGUE Y DENGUE HEMORRAGICO: ASPECTOS CLÍNICOS. Salud Publica México 1995; 37 supl; pp. 29-44.
13. Nash E.B. FUNDAMENTOS DE TERAPEUTICA HOMEOPATICA. Ediciones Lidiun; Buenos Aires, Argentina, 1979; pp. 272-273.
14. Ratre Takhampunya, Sukathida Ubol; INHIBITION OF DENGUE VIRUS REPLICATION BY MYCOPHENOLIC ACID AND RIBAVIRIN. J Gen Virol. 2006; 87: pp. 1947-1952.
15. Sandoval Luis G. FARMACOPEA HOMEOPATICA MEXICANA. Editorial B. Jain Publishers PVT. LTD. India 2004. pp. 188-189.

16. Secretaría de Salud. SITUACIÓN DE DENGUE EN MÉXICO. En página web 2008 <http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=32>. <29 abril 2008>.
17. Vannier L. MATERIA MEDICA HOMEOPATICA. Editorial Porrúa; México. 2004. pp. 216-217.
18. Vijnovsky B., TRATADO DE MATERIA MEDICA HOMEOPATICA I; Buenos Aires, Argentina. 1997. pp. 665-669.
19. Wayne C. Koff., Joe L. ELM, INHIBITION OF DENGUE VIRUS REPLICATION BY AMANTADINE HYDROCHLORIDE, Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC); 1980; Vol 1: pp. 125-129.
20. Wayne C. Koff, Robert D. Pratt, TRETMEN OF INTRACRANIAL DENGUE VIRUS INFECTIONS IN MICE WITH A LIPOPHILIC DERIVATIVE OF RIBAVIRIN, Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC); 1983; vol. 24, No 1: pp. 134-136.
21. Walcymar L. E., Gomes G. Critina, PROTOCOLO HOMEOPATICO PARA EPIDEMIAS DE DENGUE. Comisión de Salud Pública, Asociación Médica Homeopática Brasileña; Brasil 2002. pp. 1-17.
22. Zavala Parada A. TESINA: EFECTO DE VARIAS POTENCIAS HOMEOPÁTICAS DE EUPATORIUM PERFOLIATUM EN LA INFECCIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE 2 EN CÈLULAS C6/36, Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México DF, 2007. pp. 73-92.
23. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/denguepano/dengue-2010.html>
<2 septiembre del 2010>