**TITULO EN ESPAÑOL**

**Medición de la citotoxicidad y producción de citocinas en cultivos de fribroblastos gingivales humanos estimulados con Mercurius-Heel®S: Un estudio piloto**

**TITULO EN INGLES**

**Measurement of cytotoxicity and production of cytokines on human gingival fibroblasts cultured *in vitro* stimulated with Mercurius-Heel®S: A pilot study**

**AUTORES**

Adriana García1, Liliana Patiño1, Gabriela Rueda1

1 Centro de Investigaciones Odontológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia

**TITULO REDUCIDO**

**Citotoxicidad de Mercurius-Heel®S en fibroblastos gingivales**

**Palabras Clave:** Fibroblastos, Mercurius-Heel®S, citotoxicidad, citocinas

**Keywords:** Fibroblast, Mercurius-Heel®S, cytotoxicity. Cytokines

**Resumen**

**Introducción**: El *Mercurius-Heel®S* es un medicamento homeopático, utilizado para tratar patologías infecciosas principalmente de cavidad oral como la gingivitis y la periodontitis, el componente principal de este medicamento es el Mercurius solubilis, sin embargo se desconoce su efecto citotóxico o antiinflamatorio sobre fibroblastos gingivales humanos (FGH). **Materiales y métodos:** Fueutilizada la línea celular ATCC CRL-2014 de FGH, las células fueron tratadas con*Mercurius-Heel®S* a concentraciones de 300 mg/ml a 0.0005 mg/ml y como control se utilizaron células sin tratamiento. La viabilidad celular fue medida mediante la prueba colorimétrica MTS® y la expresión de citocinas (IL1β, TNFα e IL10) presentes en sobrenadante fue realizada por ELISA. El análisis estadístico se realizo mediante la prueba t para grupos independientes. **Resultados:** El incremento de la viabilidad celular con respecto al control fue mayor a concentraciones bajas del medicamento *p*=0,0005. En referencia a la producción de citocinas no se observaron diferencias estadísticamente significativas a las diferentes concentraciones de *Mercurius-Heel®S*. **Conclusión**: El *Mercurius-Heel®S* no mostró efecto citotóxico sobre FGH y tampoco evidencio incremento significativo de IL1β, IL10 y TNFα.

**Abstract**

**Introduction**: *Mercurius -Heel ® S* is a homeopathic medicine used to treat infectious diseases of the oral cavity such as gingivitis and periodontitis , the major component of this drug is Mercurius solubilis, however its cytotoxic or anti-inflammatory effect is unknown on Human Gingival Fibroblasts (HGF). **Methods**: It was used the cell line ATCC CRL- 2014 HGF, cells were treated with *Mercurius -Heel ® S* at concentrations of 300 mg / ml to 0.0005 mg / ml and were used as control cells without treatment. Cell viability was measured by the colorimetric assay MTS ® and cytokine expression ( IL1β , TNFα and IL10 ) present in supernatants was performed by ELISA . Statistical analysis was performed using the t test for independent groups. **Results**: The increase in cell viability relative to the control was higher at low concentrations p = 0.0005. The production of cytokines, no showed statistically significant difference at the various concentrations were observed *Mercurius -Heel ® S*. **Conclusion**: *Mercurius -Heel ® S* is not showed cytotoxic effect on HGF nor evidenced significant increase in IL1β , IL10 and TNFα.

Top of Form

**Resumo**

**Introdução**: *Mercurius -Heel ® S* é um remédio homeopático utilizado para tratar doenças infecciosas, da cavidade oral, tais como gengivite e periodontite , o principal componente do medicamento é Mercúrio solubilis , no entanto o seu efeito citotóxico ou anti - inflamatório é desconhecido em Fibroblastos Humanos Gengivais (FHG). **Métodos**: Foi utilizada a linha de células ATCC CRL -2014 FHG, as células foram tratadas com *Mercurius -Heel ® S* , em concentrações de 300 mg / ml de 0,0005 mg / ml, e foram usadas como as células de controlo sem tratamento . A viabilidade celular foi medida através do ensaio colorimétrico MTS ® e expressão de citoquinas ( IL1β , TNFα e de IL-10 ) presente em sobrenadantes foi realizada por ELISA . A análise estatística foi realizada utilizando o teste t para grupos independentes. **Resultados**: O aumento na viabilidade celular em relação ao controlo foi superior em baixas concentrações de p = 0,0005 . A produção de citocinas , não houve diferença estatisticamente significativa para as várias concentrações foram observadas *Mercurius -Heel ® S*. **Conclusão**: Mercurius -Heel ® S não apresentou efeito citotóxico sobre FHG nem evidenciado aumento significativo IL1β , IL10 e TNFα.

**INTRODUCCIÓN**

Los intentos para intervenir una exacerbada respuesta inflamatoria del huésped durante el curso de la enfermedad periodontal, involucran fármacos complementarios a la terapia básica (Sinha et al., 2012). Una alternativa es la medicina antihomotóxica (Almirantis, 2013; Clausen et al., 2011).

La homotoxicología fue desarrollada en el año 1955 por el médico alemán Hans-Heinrich Reckeweg, sin embargo el reciente interés de los médicos y odontólogos en proveer terapéuticas naturales que estimulen y fortalezcan el sistema inmunitario de su paciente, ha fomentado el planteamiento de proyectos innovadores en odontología, ciencia en la cual se ha iniciado la aplicación de medicamentos antihomotóxicos en forma discreta (Eames y Darby, 2011; Shaw, 2010; Mathie y Farrer, 2007).

Actualmente, se han establecido diversos protocolos de manejo biológico que incluyen este tipo de medicamentos, los cuales son administrados en dosis diluídas (decimales y centesimales) adecuados para cada patología (de Oliveira et al., 2011). El *Mercurius-Heel®S,*  es uno de éstos medicamentos y es propuesto como parte del tratamiento de base o primera elección en la vía oral para el manejo de la gingivitis, abscesos, aftas orales y para el tratamiento sintomático de la periodontitis, enfatizando su utilidad en enfermedades supurativas e inflamatorias no sólo a nivel oral sino también en tejidos periamigdalares (Farrer et al., 2013; Nayak et al., 2012; de Oliviera et al., 2011; Mousavi et al., 2009). Su composición es Mercurius solubilis Hahnemanni D10 consistente en mercurio amidonitrato, Heparsulfuris D8, Lachesis D12, Phytolacca americana D4, Ailanthus altissima D3, Echinacea angustifolia D3 30 mg, Atropa belladonna D4. Sus excipientes son estearato de magnesio y lactosa.

El mercurius solubilis, uno de los componentes principales de *Mercurius-Heel-S®*, es extraído del cinabrio y está presente en fuentes termales y volcanes. Cuando es utilizado en homotoxicología y homeopatía, es disuelto en ácido nítrico, formando partículas que se secan y se pulverizan permitiendo su posterior uso (Almirantis, 2013; de Oliveira et al., 2011). A pesar de esto, la seguridad y citotoxicidad de *Mercurius-Heel-S®* sobre fibroblastos gingivales, no ha sido demostrada representando un obstáculo ético para la implementación clínica de este tipo de medicamento. De igual manera no se han documentado si los efectos nocivos ocasionados a la intoxicación por mercurio aparezcan como resultado de la administración de este medicamento, aunque los índices terapéuticos *Heel®*, aclaran que dentro de las reacciones adversas producidas por este medicamento puede presentarse sialorrea y casos de hipersensibilidad en casos aislados.

Cabe recordar que los fibroblastos gingivales, son células que participan activamente sobre en los eventos inmunes e inflamatorios de la enfermedad periodontal, debido a que junto a otras células de defensa, producen citocinas pro-inflamatorias (Baek et al., 2013; Ara et al., 2013) como la Interleuquina 1ß (IL 1ß) (Sawada et al., 2013; Bhawal et al., 2012), y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) principalmente (Arancibia et al., 2013; Guimarães et al., 2011). Por otra parte, citocinas anti-inflamatorias como la interleuquina 10 (IL-10), que controla una respuesta inflamatoria exacerbada (Gómez-Florit et al., 2013; Morandini et al., 2011). De esta forma, la regulación de las funciones de los fibroblastos gingivales con medicamentos antihomotóxicos, podría tener un gran potencial terapéutico en periodoncia. El objetivo de este estudio fue establecer el efecto *MercuriusHeel®S* sobre fibroblastos gingivales cultivados *in vitro* a diferentes tiempos y concentraciones del medicamento.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Este estudio, fue dividido en dos fases: la primera consistió en establecer la viabilidad de los fibroblastos gingivales humanos cultivados *in vitro* estimulados durante 15 minutos y 2 horas con *MercuriusHeel®S*. En la segunda fase se determinaron los perfiles de citocinas pro-inflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF α) e Interleuquina 1 Beta (IL 1 ß) y antinflamatorias: Interleucina 10 (IL10), que fueron producidas por los fibroblastos luego de su estimulo.

**Cultivo celular:** Se utilizaron fibroblastos gingivales humanos ATCC CRL-2014 obtenidos del Centro de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana. Las células fueron cultivadas con medio D-MEM (medio esencial modificado de Dulbecco) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, 100 U /ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina (SIGMA, USA). Los pases se realizaron mediante desprendimiento enzimático, con tripsina 0.25% (SIGMA, USA) y EDTA 1mM (GIBCO) a 37° C durante 2 minutos, transcurrido ese tiempo se inactivó la tripsina con medio DMEM suplementado y se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm.

**Preparación de Mercurius Heel®S:** Se trituraron 2 tabletas de 300 mg de*MercuriusHeel®S*, en un triturador de pastillas de Acu-Life® y posteriormente fueron añadidas al DMEM para lograr las concentraciones deseadas 300 mg/ml a 0.0005 mg/ml, realizando diluciones en base de 3, a partir de 300mg/ml.

**Prueba de citotoxicidad:** La prueba utilizada fue un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo de tetrazolio (MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) Promega®. Para esta prueba se utilizaron placas de 96 pozos y se sembraron 4.000 células por pozo. Se permitió su adherencia durante 24 horas, se cambió el medio y se aplicaron los tratamientos por triplicado con *MercuriusHeel®S*, a las concentraciones de 300 mg/ml a 0.0005 mg/ml mostradas en la figura 1, durante 15 minutos y 2 horas, y se retiró el tratamiento. El grupo control consistió en células mantenidas en medio de cultivo y no tratadas. Posteriormente fue colocado a cada pozo medio D-MEM completo y se incubó por 24 horas más. Transcurrido ese tiempo se adicionó el reactivo MTS según las recomendaciones del fabricante. Finalmente luego de 2 horas fueron leídas en el espectrofotómetro a 490 nm.

**Medición de citocinas:** En la segunda fase se realizó el Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA) para establecer perfiles de citocinas presentes en los sobrenadantes como Interleucina 1 Beta (IL 1ß), Interleucina 10 (IL10) y Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF α). Los fibroblastos fueron tratados con *MercuriusHeel®S* a los 15 minutos y 2 horas de exposición con un tiempo de recuperación de 24 horas en cajas de 25 cm2 (500.000 células/caja). Los controles fueron de forma similar a la prueba del MTS. Se seleccionaron las concentraciones de 0,13 mg/ml a 0,0005 mg/ml y se utilizó la concentración de 300mg/ml como referencia a la cantidad de *Mercurius* presente por tableta. Los kits utilizados fueron Quantiquine (R&D Systems), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

**Análisis estadístico:** En la primera parte del análisis estadístico, se inició evaluando si las variables seguían una distribución normal utilizando la prueba de Shapiro Wilk, dado que no se identificaron desviaciones de dicha distribución, se supusieron normales. Luego se compararon los promedios entre cada uno de los grupos a través de la prueba t para grupos independientes. Posteriormente, se realizó un análisis descriptivo que permitiera establecer los perfiles de citocinas producidos por fibroblastos gingivales cultivados *in vitro* y estimulados con *MercuriusHeel®S.*

**RESULTADOS**

En la Tabla 1 se presentan los datos del promedio de absorbancia y el porcentaje de viabilidad según los diferentes tiempos de exposición al *Mercurius Heel ®S*. Se observa, que los mayores porcentajes de viabilidad fueron los tratamientos de 15 minutos con respecto al de las dos horas. Al realizar una comparación entre estos dos tiempos, se observaron diferencias estadísticamente significativas *p*=0.009, observando que los resultados obtenidos luego de 15 minutos de tratamiento muestran una mayor proliferación celular con respecto a las 2 horas.

Por otra parte, en la tabla 1 se observa que los mayores porcentajes de viabilidad independientemente del tratamiento de 15 minutos y 2 horas, se observa a las concentraciones más bajas de *Mercurius Heel®S* aproximadamente desde la concentración de 3,7mg/ml hasta 0.0005 mg/ml.

A los 15 minutos de tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas a partir de la concentración de 3,7 mg/ml de *Mercurius Heel®S* con respecto al control (células sin tratamiento) *p*< 0,001, mientras que a las dos horas de tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas a las concentración de 3,7 mg/ml a 0,4 mg/ml y de 0,015 mg/ml a 0,0005 mg/ml de *Mercurius Heel®S* con respecto al control *p*=0,0005.

Estos resultados nos sugieren que a corto tiempo el tratamiento en contacto con las células es suficiente para obtener buenos resultados. Lo que de cierta forma puede indicar que la tableta de *Mercurius Heel®S* el tiempo que tarda en disolverse en boca (aproximadamente 15 minutos) es suficiente para su mejor y mayor resultado.

La segunda fase del estudio, se evaluaron las concentraciones de citocinas producidas por los fibroblastos gingivales humanos luego del estímulo del *Mercurius Heel®S*. En la figura 1 se muestran los perfiles de IL-1 ß, TNF α, e IL-10. En este caso y basados en los resultados del MTS las células fueron tratadas a las concentraciones de 300 mg/ml (equivalente a 1 tableta) y desde 0,13 mg/ml hasta 0,0005 mg/ml de *Mercurius Heel®S* concentraciones que presentaron mayor viabilidad celular*.*

Con respecto a la IL-1 ß(Figura 1A) se observa en general una mayor producción en concentraciones intermedias del tratamiento (0.13 a 0.005mg/ml) mientras que a concentraciones bajas (0.0005mg/ml) y elevadas (300mg/ml) del medicamento su producción fue menor. A través del tiempo (15 minutos y dos horas) de exposición, no se observan diferencias estadísticamente significativas ni entre tiempos ni entre tratamientos *p*=0,71 y *p*=0,18 respectivamente.

En referencia al TNF α (Figura 1B), no se observa una tendencia definida relacionada con las concentraciones en ninguno de los tiempos estudiados. Sin embargo, la mayor producción se observa a 0.13 y 0.01 mg/ml tanto a los 15 minutos como a las 2 horas. En las menores concentraciones de 0.005, 0.0005 mg/ml, así como en altas concentraciones 300 mg/ml y 0.04 mg/ml de *Mercurius Heel®S* disminuye la producción de TNF α por parte de los fibroblastos gingivales humanos. Al comparar la cinética de esta citocina es muy similar tanto a los 15 minutos como a las 2 horas de tratamiento. No se observan diferencias estadísticamente significativas en estos tiempos *p*=0,66, y con respecto a los diferentes tratamientos tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas *p*=0,16.

Por último, la producción de IL-10 (Figura 1C),en general fue la citocina que junto con la IL1β tuvieron menor concentración en el presente estudio (menor a 400mg/ml de citocina), además se puede observar que tanto a los 15 minutos como a las 2 horas, existe una tendencia a aumentar la concentración de IL-10 a medida que disminuye la concentración de *Mercurius Heel®S*, encontrándose las concentraciones más altas de esta citocina a los 0.0005 mg/ml contrario a esto, las concentraciones más bajas de IL-10 se observan a la mayor concentración del medicamento (300 mg/ml). Adicionalmente, la producción resulta similar a los 15 minutos comparada con las 2 horas. No se observan diferencias estadísticamente significativas ni entre tiempos ni entre tratamientos *p*=0,98 y *p*=0,34 respectivamente.

**DISCUSIÓN**

La presente investigación se planteó con el fin de determinar el efecto del *Mercurius-Heel®-S* sobre la viabilidad de los fibroblastos gingivales humanos cultivados *in vitro*; con el fin de ver su posible uso como parte del tratamiento de la enfermedad periodontal, caracterizada por una respuesta inflamatoria generada por bacterias periodontopatógenas como la *Porphyromona gingivalis* ocasionando una reabsorción ósea y perdida en el tejido de soporte del diente (Hajishengallis et al., 2011).

En un estudio realizado por Farrer y colaboradores en el 2013, evaluaron la prescripción homeopática en enfermedad periodontal aguda y crónica principalmente con Hepar sulphuris, Arsenicum album, Calcarea carbonicum, Mercurius corrosivus, entre otros, dichas prescripciones fueron hechas por tres odontólogos a 51 pacientes durante 18 meses en el Reino Unido, encontrando resultados positivos en cuanto a la reducción de la bolsa periodontal, sugiriendo que la homeopatía es un área promisoria en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Se ha propuesto que el *MercuriusHeel®S* puede ser utilizado para diversas patologías orales como gingivitis y periodontitis, sin embargo no se ha documentado el efecto que presenta este medicamento en los fibroblastos gingivales humanos. El Mercurius solubilis, es el mayor componente del *MercuriusHeel®S*; es extraído del cinabrio, también conocido como cinabrita, compuesto en un 85% por mercurio, presente en fuentes termales y volcanes (de Oliveira et al., 2011).

En la presente investigación, uno de los principales hallazgos fue el aumento de la viabilidad celular. Se observó que el *MercuriusHeel®S* no presentó ningún efecto citotóxico en los fibroblastos gingivales humanos, al utilizar concentraciones entre 300mg/ml (una tableta) a 0,0005mg/ml. Al igual que en el estudio de Oliveira, nosotros también obtuvimos mejores resultados en concentraciones bajas del medicamento, lo que favorece lo descrito por la homotoxicología, donde se considera que cuanto más diluido esté un medicamento homeopático, más potentes es (Rutten, 2011; Novella et al., 2008; Gold et al., 2008). Por otra parte, también observamos que a corto periodo de tiempo (15 minutos) es suficiente para obtener buenos resultados, tiempo en el cual la tableta se disuelve en boca (Patel et al., 2010; Chandira et al., 2010), y su efecto puede observarse hasta 48 horas después de ejercido el estímulo.

En la segunda fase del estudio, se establece que los niveles de citocinas pro-inflamatorias TNF α e IL-1 ß producidas por fibroblastos tratados con *MercuriusHeel®S* son mayores a concentraciones bajas del medicamento, siendo muy poca la diferencia a través de los tiempos de exposición. De igual manera, para la citocina antinflamatoria IL-10, demostró aumentar a medida que disminuye la concentración de *MercuriusHeel®S*.

Con respecto a los perfiles de citocinas, el único estudio con Mercurius solubilis fue realizado por de Oliviera y colaboradores en el 2011 donde se muestra que en macrófagos peritoneales de ratón como células capaces de modular la respuesta inmune, observando que a muy bajas concentraciones del Mercurius, la respuesta del macrófago en cuanto a citocinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se incrementaba, indicando una activación en la respuesta inmune e inflamación por aumento del óxido nítrico y la producción IFNγ. Sin embargo, naturalmente luego de la eliminación del agente causal de la inflamación es necesario la activación de respuesta antiinflamatoria como la IL4, la cual observaron que también se incrementaba, sugiriendo que el Mercurius solubilis es capaz de modular la respuesta del macrófago induciendo un balance y homeóstasis entre una respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria estimulados con concentraciones centesimales de Mercurius solubilis de 10mg a 300µg, encontrando que IFNγ e IL4 aumenta su expresión en sobrenadantes, sin embargo TNFα, IL-2 e IL-5 no cambian su expresión con respecto al grupo no tratado, resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio.

Finalmente gracias a los resultados de esta investigación podemos sugerir que el *MercuriusHeel®S* puede ser usado como adyuvante o complemento al tratamiento de la enfermedad periodontal, por ser ésta una patología con un alto componente infeccioso y del huésped principalmente asociado a respuesta inmunológica, ya que este medicamento puede regular la respuesta inmune frente a patógenos y no causa un efecto letal o dañino a las células del hospedero e incluso promueve proliferación celular, lo que indica su potencial uso en regeneración periodontal.

**Conclusión**

El *MercuriusHeel®S* tiene su mejor efecto a los 15 minutos y en bajas concentraciones de tratamiento, sin embargo no se observaron diferencias en la producción de citocinas pro y anti inflamatorias con respecto a las células sin tratamiento.

**Agradecimientos**

Agradecemos a la Vicerrectoria de investigación de la Pontificia Universidad Javeriana por su apoyo financiero para la ejecución de este trabajo ID 004485 y al Centro de Investigaciones odontológicas por sus instalaciones para la realización del presente estudio.

**Correspondencia**

Dabeiba Adriana García, garciad@javeriana.edu.co

Gabriela Rueda, gruedamartinez@gmail.com

**Conflicto de interés**

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses

**REFERENCIAS**

[Almirantis Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Almirantis%20Y%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23622261). (2013) Homeopathy--between tradition and modern science: remedies as carriers of significance. [*Homeopathy*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Homeopathy+almirantis) 102:114-22

[Ara T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ara%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19515019), [Kurata K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kurata%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19515019), [Hirai K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hirai%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19515019), [Uchihashi T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Uchihashi%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19515019), [Uematsu T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Uematsu%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19515019), [Imamura Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Imamura%20Y%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19515019), [Furusawa K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Furusawa%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19515019), [Kurihara S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kurihara%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19515019), [Wang PL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20PL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19515019). (2009) Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. [*J Periodontal Res*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19515019) 44:21-7

[Arancibia R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Arancibia%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22813343), [Oyarzún A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Oyarz%C3%BAn%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22813343), [Silva D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Silva%20D%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22813343), [Tobar N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tobar%20N%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22813343), [Martínez J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mart%C3%ADnez%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22813343), [Smith PC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Smith%20PC%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22813343). (2013) Tumor necrosis factor-α inhibits transforming growth factor-β-stimulated myofibroblastic differentiation and extracellular matrix production in human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 84:683-93.

[Bhawal UK](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bhawal%20UK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Ito Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ito%20Y%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Tanimoto K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tanimoto%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Sato F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sato%20F%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Fujimoto K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fujimoto%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Kawamoto T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kawamoto%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Sasahira T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sasahira%20T%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Hamada N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hamada%20N%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Kuniyasu H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kuniyasu%20H%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Arakawa H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Arakawa%20H%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Kato Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kato%20Y%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784), [Abiko Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Abiko%20Y%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22644784). (2012) IL-1β-mediated up-regulation of DEC1 in human gingiva cells via the Akt pathway. *J Cell Biochem* 113:3246-53

[Baek KJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Baek%20KJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24011303), [Choi Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Choi%20Y%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24011303), [Ji S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ji%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24011303). (2013) Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. [*Arch Oral Biol*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011303) 58:1282-92

[Chandira RM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chandira%20RM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=20363696), [Venkataeswarlu BS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Venkataeswarlu%20BS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=20363696), [Kumudhavalli MV](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kumudhavalli%20MV%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=20363696), [Debjitbhowmik](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Debjitbhowmik%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=20363696), [Jayakar B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jayakar%20B%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=20363696). (2010) Formulation and evaluation of mouth dissolving tablets of the Etoricoxib. *Pak J Pharm Sci* 23:178-81.

Clausen J, van Wijk R, Albrecht H. (2011) [Review of the use of high potencies in basic research on homeopathy.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962205) *Homeopathy* 100:288-92.

[de Oliveira SM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=de%20Oliveira%20SM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21962197), [de Oliveira CC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=de%20Oliveira%20CC%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21962197), [Abud AP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Abud%20AP%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21962197), [Guimarães Fde S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Guimar%C3%A3es%20Fde%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21962197), [Di Bernardi RP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Di%20Bernardi%20RP%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21962197), [Coletto EL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Coletto%20EL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21962197), [BuchiDde F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Buchi%20Dde%20F%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21962197). (2011) Mercuriussolubilis: actions on macrophages. [*Homeopathy*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962197)100:228-36.

[Eames S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Eames%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21475273), [Darby P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Darby%20P%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21475273). (2011) Homeopathy and its ethical use in dentistry.*[Br Dent J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=homeopathic+eames" \o "British dental journal.)* 210:299-301.

Farrer S, Baitson ES, Gedah L, Norman C, Darby P, Mathie RT. (2013) Homeopathic prescribing for chronic and acute periodontal conditions in 3 dental practices in the UK. [*Homeopathy*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=haila+2005+salivary)102:242-7.

[Gómez-Florit M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=G%C3%B3mez-Florit%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24144630), [Ramis JM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ramis%20JM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24144630), [Monjo M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Monjo%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24144630). (2013) Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts in vitro. *Biochem Pharmacol* 86:1784-90

[Guimarães MR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Guimar%C3%A3es%20MR%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21306385), [Coimbra LS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Coimbra%20LS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21306385), [de Aquino SG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=de%20Aquino%20SG%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21306385), [Spolidorio LC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Spolidorio%20LC%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21306385), [Kirkwood KL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kirkwood%20KL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21306385), [Rossa C Jr](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rossa%20C%20Jr%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21306385). (2011) Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo*. J Periodontal Res* 46:269-79.

Gold PW, Novella S, Roy R, Marcus D, Bell I, Davidovitch N, Saine A. (2008) Homeopathy--quackery or a key to the future of medicine? *Homeopathy* 97:28-33.

Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, McIntosh ML, Alsam A, Kirkwood KL, Lambris JD, Darveau RP, Curtis MA. (2011) [Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036469) *Cell Host Microbe* 10:497-506

Mathie RT, Farrer S. (2007) [Outcomes from homeopathic prescribing in dental practice: a prospective, research-targeted, pilot study.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17437932) *Homeopathy* 96:74-81.

Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. (2011) [Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF-β, interleukin (IL)-8 and IL-10.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537641) *Braz Oral Res* 25:157-62

[Mousavi F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mousavi%20F%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19647206), [Mojaver YN](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mojaver%20YN%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19647206), [Asadzadeh M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Asadzadeh%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19647206), [Mirzazadeh M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mirzazadeh%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19647206).(2009) Homeopathic treatment of minor aphthous ulcer: a randomized, placebo-controlled clinical trial. [*Homeopathy*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Homeopathic+treatment+of+minor+aphthous+ulcer%3A)98:137-41.

[Nayak C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nayak%20C%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Singh V](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Singh%20V%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Singh VP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Singh%20VP%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Oberai P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Oberai%20P%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Roja V](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Roja%20V%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Shitanshu SS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shitanshu%20SS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Sinha MN](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sinha%20MN%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Deewan D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Deewan%20D%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Lakhera BC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lakhera%20BC%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Ramteke S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ramteke%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Kaushik S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kaushik%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Sarkar S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sarkar%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Mandal NR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mandal%20NR%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Mohanan PG](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mohanan%20PG%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Singh JR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Singh%20JR%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Biswas S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Biswas%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367), [Mathew G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mathew%20G%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=22487367).(2012) Homeopathy in chronic sinusitis: a prospective multi-centric observational study. [*Homeopathy*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Homeopathy+in+chronic+sinusitis%3A+a+prospective)101:84-91.

Novella S, Roy R, Marcus D, Bell IR, Davidovitch N, Saine A. (2008) A debate: homeopathy--quackery or a key to the future of medicine*? J Altern Complement Med* 14: 9-15.

[Patel BP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Patel%20BP%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21218071), [Patel JK](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Patel%20JK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21218071), [Rajput GC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rajput%20GC%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21218071), [Thakor RS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Thakor%20RS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21218071). (2010) Formulation and evaluation of mouth dissolving tablets of cinnarizine. *Indian J Pharm Sci* 72:522-5

[Rutten AL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rutten%20AL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=21784335). (2011) Comparison of effectiveness of frequently and infrequently used homeopathic medicines. [*Homeopathy*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=effectiveness+homeopathic+Rutten+2011) 100:175-82.

[Sawada S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sawada%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23428978), [Chosa N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chosa%20N%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23428978), [Ishisaki A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ishisaki%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23428978), [Naruishi K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Naruishi%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23428978). (2013) Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1β and IL-6. *Biomed Res* 34:31-40

 Shaw D. (2010) Unethical aspects of homeopathic dentistry.*Br Dent J* 209:493-6.

Sinha MN, Siddiqui VA, Nayak C, Singh V, Dixit R, Dewan D, Mishra A. (2012) Randomized controlled pilot study to compare Homeopathy and Conventional therapy in Acute Otitis Media. *Homeopathy* 101:5-12.