

## Artículo de revisión

# \**Drosera Rotundifolia* en Dosis Bajas Induce Cambios en la Expresión Genética en las Células Epiteliales Bronquiales Humanas 16HBE

\*\*Fabio Arruda-Silva, Paolo Bellavite, Marta Marzotto

## PALABRAS CLAVE:

*Drosera*, *Drosera rotundifolia*, Células epiteliales bronquiales, Enfermedades respiratorias, Homeopatía y enfermedades respiratorias.

## Resumen

*Drosera rotundifolia* se ha utilizado tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades respiratorias en la fitoterapia y la Homeopatía. Los mecanismos de acción reconocidos hasta el momento se relacionan con los efectos conocidos de componentes específicos, como los flavonoides, aunque no se comprenden del todo. En el presente estudio se exploraron las funciones biológicas de *Drosera rotundifolia* *in vitro* después del tratamiento de células epiteliales bronquiales, que son objetivos potenciales de los efectos farmacológicos del medicamento herbolario.

Para hacerlo, el extracto etanólico de toda la planta se diluyó 1000 veces en agua (*D. rotundifolia* 3X) y se añadió a un cultivo de la línea celular humana 16HBE entre 3 y 6 horas. Los efectos sobre la expresión genética de los tratamientos y los controles correspondientes fueron entonces investigados mediante secuenciación de ARN. Los genes expresados de forma diferencial fueron validados a través de RT-qPCR y se investigaron las funciones biológicas enriquecidas involucradas en los efectos del tratamiento. *D. rotundifolia* 3X no afectó la viabilidad celular y mostró ser un estimulante de las funciones celulares a través de la regulación de la expresión de docenas de genes después de 3 horas, con una amplificación de los efectos después de 6 horas de tratamiento. Los principales genes expresados de forma diferencial codificaron ligandos del receptor del factor de crecimiento epitelial, proteínas involucradas en la desintoxicación xenobiótica y citocinas, lo que sugiere que *D. rotundifolia* 3X podría estimular los sistemas de auto-reparación, los cuales se ven afectados en las enfermedades de las vías respiratorias. Adicionalmente, *D. rotundifolia* 3X actúa sobre una serie compleja y multifacética de genes y podría afectar potencialmente distintas capas de la mucosa bronquial.

## Abstract

*Drosera rotundifolia* has been traditionally used for the treatment of respiratory diseases in phytotherapy and homeopathy. The mechanisms of action recognized so far are linked to the

\*Acceso abierto. El presente artículo cuenta con la Licencia Internacional Creative Commons Attribution 4.0, que permite utilizarlo, compartirlo, adaptarlo, distribuirlo y reproducirlo en cualquier medio o formato, siempre y cuando se proporcionen los créditos correspondientes al autor(es) original(es) y la fuente. Publicado en línea el 27 de enero de 2021, en: [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports).

\*\*Departamento de Medicina, Universidad de Verona, strada Le Grazie 8, 37134 Verona, Italia. Correo electrónico: [fabio.arrudaesilva@univr.it](mailto:fabio.arrudaesilva@univr.it)

**KEYWORDS:**

Drosera, Drosera rotundifolia, Bronchial epithelial cells, Respiratory diseases, Homeopathy and respiratory diseases.

*known effects of specific components, such as flavonoids, but are not completely understood. In this study, the biological functions of **D. rotundifolia** were explored in vitro following the treatment of bronchial epithelial cells, which are the potential targets of the pharmacological effects of the herbal medicine.*

*To do so, the whole plant ethanolic extract was 1000-fold diluted in water (**D. rotundifolia** 3X) and added to a 16HBE human cell line culture for 3 h or 6 h. The effects on gene expression of the treatments and corresponding controls were then investigated by RNA sequencing. The differentially expressed genes were validated through RT-qPCR, and the enriched biological functions involved in the effects of treatment were investigated. **D. rotundifolia** 3X did not impair cell viability and was shown to be a stimulant of cell functions by regulating the expression of dozens of genes after 3 h, and the effects were amplified after 6 h of treatment. The main differentially expressed genes encoded ligands of epithelial growth factor receptor, proteins involved in xenobiotic detoxification and cytokines, suggesting that **D. rotundifolia** 3X could stimulate self-repair systems, which are impaired in airway diseases. Furthermore, **D. rotundifolia** 3X acts on a complex and multifaceted set of genes and may potentially affect different layers of the bronchial mucosa.*

## Introducción

Las patologías de las vías respiratorias se encuentran entre las enfermedades más comunes. La tos es una afección habitual en pacientes de todas las edades, en donde los contaminantes del aire constituyen un desafío para las vías respiratorias. En los niños, la tos es el segundo síntoma más común de enfermedad respiratoria, después del escurrimiento nasal, con una prevalencia de entre 46 y 56 por ciento, dependiendo de la edad del niño.

El uso de tratamiento farmacológico sin efectos secundarios podría ser útil no sólo para reducir los síntomas de la tos, sino también para evitar los efectos tóxicos de la contaminación. En adultos y niños se utilizan en gran medida dosis bajas de fármacos provenientes de plantas para los síntomas de la tos y el resfriado<sup>1-7</sup>. Con frecuencia, éstos se utilizan con la esperanza de resolver padecimientos que no se curan con éxito utilizando fármacos convencionales, como tratamiento complementario para reducir el consumo de fármacos antiinflamatorios o esteroides que pudieran tener efectos adversos, así como para aliviar ciertos síntomas y mejorar la calidad de vida. Sin embargo, en la actualidad no existe una explicación concluyente de la posible actividad biológica de tales preparaciones a nivel celular.

Las especies europeas de drosera (*Drosera rotundifolia* L., *Drosera intermedia* Hayne y *Drosera anglica* Huds.) se han utilizado como medicamentos tradicionales en el tratamiento de infecciones del tracto

respiratorio. El género *Drosera* (*Drosera herba*), que se compone principalmente de *Drosera rotundifolia*, se ha usado comúnmente por sus propiedades espasmolíticas en el tratamiento de la tosferina o tos convulsiva desde el siglo XVII. La acción general de **D. rotundifolia** sobre el sistema respiratorio fue descrita en la Materia Médica homeopática<sup>8</sup>, incluyendo expectoración profusa y tos espasmódica, paroxismal, seca e irritativa, similar a la tosferina, y la planta se incluye con frecuencia como componente en los complejos homeopáticos utilizados para los padecimientos del tracto respiratorio superior. La eficacia de tales remedios para el alivio de los síntomas o el mejoramiento de la calidad de vida ha sido analizada en estudios clínicos, los cuales han reportado resultados positivos<sup>5, 9-12</sup>.

Los extractos de etanol de las especies de *Drosera* contienen altas concentraciones de flavonoides (hiperósido, isoquercitrina, quercetina y miricetina-3-O-galactósido) junto con ácidos fenólicos (ácido elágico)<sup>13</sup>. Se ha reportado que los flavonoides tienen propiedades antiinflamatorias<sup>14</sup>, antioxidantes y antimicrobianas, las cuales son eficaces en el tratamiento de las enfermedades respiratorias<sup>15</sup>. También se han encontrado trazas de naftoquinonas en algunas preparaciones<sup>16</sup>.

Las células epiteliales bronquiales son células especializadas estrictamente conectadas con un tejido que forma una barrera protectora contra los agentes externos que provocan daño. La integridad de la membrana epitelial podría ser lastimada por eventos patogénicos que dañan las actividades

celulares basales (el estrés oxidativo, equilibrio energético, viabilidad y ciclo celular) o afectan actividades específicas, como el mantenimiento del equilibrio electrolítico (funcionamiento de los canales iónicos de membrana)<sup>17-19</sup>. Con la estimulación apropiada, el epitelio bronquial puede contribuir a la inmunidad innata mediante la secreción de mediadores inmunomoduladores e inmunoestimuladores, incluyendo las citocinas, quimioquinas, factores de crecimiento y mediadores de lípidos que reclutan y activan células efectoras y células presentadoras de antígenos<sup>20-22</sup>. Las células 16HBE diferenciadas simulan muchas de las actividades del epitelio bronquial y se consideran un buen modelo para los estudios básicos.

El propósito del presente estudio ha sido evaluar el efecto de una baja concentración homeopática de extracto etanólico de *D. rotundifolia* sobre el transcriptoma de la línea celular epitelial bronquial humana 16HBE. La transcriptómica, que es una importante herramienta de la investigación genómica funcional, puede utilizarse para estudiar la función y la expresión genética general, lo cual podría constituir el primer paso en el descubrimiento de los mecanismos moleculares y procesos biológicos específicos que se encuentran involucrados en la ocurrencia de la enfermedad.

Para el presente estudio, se utilizó una tercera dilución decimal (3X) de *D. rotundifolia* (1000 veces más diluida que el extracto etanólico completo). La terminología 3X corresponde a la nomenclatura homeopática tradicional conforme a la convención angloamericana<sup>23</sup>. La meta del estudio ha sido descubrir los objetivos genéticos potenciales de *D. rotundifolia* 3X después de una incubación de 3 y 6 horas por medio de la técnica de secuenciación de ARN. Después de la validación de los genes principales mediante el uso de RT-qPCR, se identificaron las principales funciones biológicas involucradas en la acción de *D. rotundifolia* 3X.

## Resultados

### a) Análisis de los polifenoles en el extracto etanólico de *D. rotundifolia*

Se estimó que la concentración de polifenoles en el extracto etanólico de *D. rotundifolia* fue de  $7.1 \times 10^{-3}$  mol/L en términos de equivalentes de ácido gálico. Esta concentración corresponde a aproximadamente 1.2 mg/mL de polifenoles totales que, a su vez, corresponde a una concentración de 12  $\mu\text{g/mL}$  en la

muestra de prueba de *D. rotundifolia* 3X y de 1.2  $\mu\text{g/mL}$  ( $7.1 \times 10^{-6}$  mol/L) en el cultivo celular final. El extracto etanólico de *D. rotundifolia* también se analizó cualitativamente mediante espectrometría de masa. En el pico del tiempo de retención de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) de 6.590 min., el espectro de masa mostró picos correspondientes a ácido elágico ( $m/z = 300.997905$ ) e isoquercitrina ( $m/z = 463.087935$ ). Adicionalmente, en el pico del tiempo de retención de 8.004 min., se detectó quercetina ( $m/z = 301.035282$ ).

En relación con la presencia de hiperósido, que tiene la misma masa molecular que la isoquercitrina, hay una posibilidad de que el pico de isoquercitrina representara una mezcla de ambos compuestos. Los resultados confirmaron la presencia de importantes componentes bioactivos en el extracto etanólico de *D. rotundifolia*<sup>13</sup>.

### b) Efecto de *D. rotundifolia* 3X sobre la viabilidad celular de 16HBE

La viabilidad de las células epiteliales bronquiales (16HBE) (figura 1) no se vio afectada después de una exposición de 3 horas a *D. rotundifolia* 3X o al correspondiente control (Ctrl), lo que demostró la ausencia de citotoxicidad provocada por la preparación de la planta con las diluciones utilizadas en los experimentos. Además, después de 24 horas de incubación con *D. rotundifolia* 3X, las células mostraron un incremento pequeño (+6.9%) pero significativo ( $p = 0.019$ ) de la viabilidad celular. No pudieron observarse cambios morfológicos ni alteración de la adherencia de las células al fondo del pocillo mediante inspección óptica microscópica (datos no mostrados).

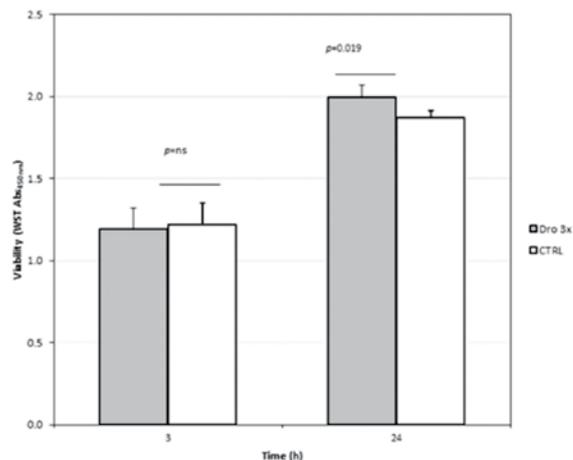


Figura 1. Viabilidad de las células 16HBE incubadas con *D. rotundifolia* 3X o Ctrl durante 3 o 24 horas. El ensayo colorimétrico se basó en la reducción del reactivo WST que se describe en la sección **Materiales y método**.  
**Viability** = viabilidad.  
**Time** = tiempo.

### c) Cambios en la expresión genética después del tratamiento con *D. rotundifolia* 3X

Los efectos del tratamiento con *D. rotundifolia* 3X sobre la expresión genética global de las células 16HBE fueron investigados después de 3 horas de incubación mediante comparación con el control. Los experimentos fueron reproducidos en 4 réplicas biológicas distintas, mientras que el perfil de expresión genética como respuesta al tratamiento con *D. rotundifolia* 3X se investigó mediante el análisis de la secuenciación de ARN.

Las lecturas obtenidas mediante la secuenciación fueron cuantificadas como transcritos genéticos por Salmon, que mostró una cobertura

de mapeo promedio del 92%. Se realizó entonces un análisis de la expresión genética diferencial para identificar los genes objetivo significativos del tratamiento con *D. rotundifolia* 3X. El resultado de la expresión diferencial obtenido del análisis de DESeq2 mostró un total de 69 genes expresados de forma diferencial (DEG, por sus siglas en inglés) estadísticamente significativos ( $p_{adj} < 0.05$ ); 44 genes fueron regulados por incremento (tabla 1), mientras que 25 genes fueron regulados por disminución (tabla 2). El valor de  $\log_2$  fold change (proporción de cambio  $\log_2$ ) osciló entre +0.7 (máxima regulación por incremento, tabla 1) y -0.51 (máxima regulación por disminución, tabla 2).

Identificación de ENSEMBL	Símbolo	Log2 fold change	lfcSE	Media base	padj	Descripción genética
ENSG00000138061	<i>CYP1B1</i>	0.702	0.036	18,306.85	2.5E-79	Citocromo P450 familia 1 subfamilia B miembro 1
ENSG00000163659	<i>TIPARP</i>	0.607	0.062	3055.70	7.7E-19	Polimerasa de poli(ADP.ribosa) inducible por TCDD
ENSG00000124882	<i>EREG</i>	0.437	0.069	3248.29	1.5E-07	Epiregulina
ENSG00000115008	<i>IL1A</i>	0.436	0.060	3083.65	1.4E-09	Interleucina 1 alfa
ENSG00000197632	<i>SERPINB2</i>	0.413	0.062	2963.76	4.0E-08	Serpina familia B miembro 2
ENSG00000260261	<i>AC124944.3</i>	0.391	0.063	424.71	2.9E-07	Pseudogen de muerte celular programada 6 (PDCD6)
ENSG00000118564	<i>FBXL5</i>	0.365	0.064	1637.91	1.3E-05	Proteína con repetición rica en leucina y caja F 5
ENSG00000109321	<i>AREG</i>	0.340	0.059	5103.51	6.4E-06	Anfiregulina
ENSG00000182585	<i>EPGN</i>	0.335	0.064	1402.14	1.0E-04	Mitógeno epitelial
ENSG00000139289	<i>PHLDA1</i>	0.311	0.054	3077.59	7.9E-06	Dominio similar a homología de pleckstrina familia A miembro 1
ENSG00000235220	<i>HLA-F</i>	0.306	0.062	315.13	4.2E-04	Complejo de histocompatibilidad mayor, clase I, F
ENSG00000104361	<i>NIPAL2</i>	0.287	0.063	662.15	1.8E-03	Dominio similar a NIPA con contenido de 2
ENSG00000119927	<i>GPAM</i>	0.277	0.070	1520.61	2.1E-02	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa, mitocondrial
ENSG00000081041	<i>CXCL2</i>	0.273	0.070	525.50	2.8E-02	Ligando de quimiocina con motivo C-X-C 2
ENSG00000277758	<i>FO681492.1</i>	0.266	0.051	96.38	3.2E-05	Sinaptotagmina-15
ENSG00000175414	<i>ARL10</i>	0.258	0.063	339.66	9.1E-03	GTPasa 10 similar a factor de ribosilación de ADP
ENSG00000120738	<i>EGR1</i>	0.256	0.046	3828.16	2.5E-05	Respuesta de crecimiento temprano 1
ENSG00000154639	<i>CXADR</i>	0.254	0.062	1339.05	1.4E-02	Molécula de adhesión celular similar a CXADR Ig
ENSG00000087074	<i>PPP1R15A</i>	0.252	0.047	3208.72	7.8E-05	Subunidad reguladora 1 de fosfatasa proteínica 15A
ENSG00000178295	<i>GEN1</i>	0.248	0.054	1919.26	2.4E-03	Endonucleasa flap 5' de unión GEN1 Holliday
ENSG00000139292	<i>LGR5</i>	0.247	0.054	102.30	1.8E-03	Receptor acoplado a proteína G con contenido de repetición rico en leucina 5
ENSG00000136244	<i>IL6</i>	0.244	0.066	1010.05	5.0E-02	Interleucina 6
ENSG00000005243	<i>COPZ2</i>	0.243	0.063	159.54	2.3E-02	Complejo de revestimiento COPI subunidad zeta 2
ENSG00000235030	<i>IER3</i>	0.233	0.049	3086.81	1.1E-03	Respuesta temprana inmediata 3
ENSG00000111912	<i>NCOA7</i>	0.230	0.043	7681.40	8.6E-05	Coactivador de receptor nuclear 7
ENSG00000118523	<i>CTGF</i>	0.229	0.060	1498.96	3.9E-02	Factor de red de comunicación celular 2
ENSG00000103995	<i>CEP152</i>	0.225	0.062	622.41	2.9E-02	Proteína centrosomal 152
ENSG00000159086	<i>PAXBP1</i>	0.221	0.057	1656.63	2.9E-02	Proteína de unión PAX3 and PAX7 1
ENSG00000102804	<i>TSC22D1</i>	0.212	0.048	2739.98	4.5E-03	Miembro de familia 1 de dominio TSC22
ENSG00000108669	<i>CYTH1</i>	0.212	0.057	1860.07	5.0E-02	Citohesina 1
ENSG00000134294	<i>SLC38A2</i>	0.208	0.032	11,532.92	1.0E-07	Portador de soluto familia 38 miembro 2
ENSG00000103257	<i>SLC7A5</i>	0.194	0.030	35,338.50	1.4E-07	Portador de soluto familia 7 miembro 5

ENSG00000129474	AJUBA	0.181	0.042	5412.41	6.6E-03	Proteína Ajuba LIM
ENSG00000100644	HIF1A	0.180	0.045	6302.38	1.8E-02	Factor inducible por hipoxia 1 subunidad alfa
ENSG00000138434	ITPRID2	0.152	0.039	18,731.03	3.4E-02	Dominio de intersección con ITPR con contenido de 2
ENSG00000010310	GIPR	0.151	0.036	120.73	2.5E-03	Receptor del polipéptido inhibidor gástrico
ENSG00000128272	ATF4	0.146	0.037	12,347.69	2.4E-02	Factor de transcripción de activación 4
ENSG00000023445	BIRC3	0.137	0.037	13,084.30	5.0E-02	Repetición de IAP baculoviral IAP con contenido de 3
ENSG00000206489	PPP1R10	0.106	0.026	26.98	1.0E-07	Fosfatasa proteínica 1 subunidad regulatoria 10
ENSG00000278516	LENG1	0.050	0.018	12.47	9.7E-04	Grupo de receptores de leucocitos miembro 1
ENSG00000061455	PRDM6	0.032	0.019	21.63	1.4E-02	Dominio de PR/SET 6
ENSG00000173503	LTA	0.028	0.016	15.34	2.9E-02	Linfotoxina alfa
ENSG00000189068	VSTM1	0.027	0.016	24.23	6.6E-03	Dominio de grupo V y transmembrana con contenido de 1
ENSG00000275428	AC024940.6	0.026	0.016	23.11	3.3E-03	Ovostatina 2

**Tabla 1.** Genes regulados por incremento estadísticamente significativos en células 16HBE tratadas durante 3 horas con *D. rotundifolia* 3X. La tabla reporta la identificación de genes (Identificación de ENSEMBL, el símbolo y la descripción de los genes), el grado de los cambios en la expresión promedio para los cuatro experimentos (log2 fold change o proporción de cambio log2), el error estándar del cambio (lfcSE), el valor de expresión medio expresado como los conteos de lectura normalizados (Media Base) y los valores *p* ajustados (padj) corregidos mediante el método de Benjamini-Hochberg (BH).

Identificación de ENSEMBL	Símbolo	Log2 fold change	lfcSE	Media base	padj	Descripción genética
ENSG00000059804	SLC2A3	- 0.510	0.070	2797.19	1.4E-09	Portador de soluto familia 2 miembro 3
ENSG00000165507	DEPP1	- 0.482	0.070	807.55	2.1E-08	Regulador de autofagia DEPP1
ENSG00000116285	ERRF1	- 0.384	0.064	5529.11	2.5E-06	Inhibidor de retroalimentación de receptor ERBB 1
ENSG00000168209	DDIT4	- 0.323	0.065	4188.35	3.7E-04	Transcripto inducible de daño de ADN 4
ENSG00000146830	GIGYF1	- 0.322	0.068	2461.89	1.2E-03	Proteína 1 GYF que interactúa con GRB10
ENSG00000183691	NOG	- 0.303	0.070	430.04	5.2E-03	Nogina
ENSG00000204267	TAP2	- 0.297	0.070	824.16	9.1E-03	Transportador 2, miembro de la subfamilia de casete de enlace de ATP B
ENSG00000213859	KCTD11	- 0.284	0.063	1506.09	2.8E-03	Dominio de tetramerización de canal de potasio con contenido de 11
ENSG00000169992	NLGN2	- 0.273	0.068	1214.66	1.6E-02	Neuroigina 2
ENSG00000171345	KRT19	- 0.269	0.050	30,099.26	8.1E-05	Queratina 19
ENSG00000148926	ADM	- 0.266	0.070	392.45	3.9E-02	Adrenomedulina
ENSG00000177606	JUN	- 0.260	0.062	1999.96	9.1E-03	Proto-oncógeno de Jun, subunidad del factor de transcripción de AP-1
ENSG00000145331	TRMT10A	- 0.259	0.068	387.61	3.8E-02	Metiltransferasa de tRNA 10A
ENSG00000135636	DYSF	0.253	0.056	2045.20	2.7E-03	Disferlina
ENSG00000099308	MAST3	- 0.253	0.066	455.28	2.9E-02	Quinasa de serina/treonina asociadas microtúbulos 3
ENSG00000113369	ARRDC3	- 0.244	0.059	942.12	1.4E-02	Dominio de arrestina con contenido de 3
ENSG00000104517	UBR5	- 0.235	0.056	3357.96	1.0E-02	N-recognina 5 del componente de la proteína ligasa ubiquitina E3
ENSG00000186352	ANKRD37	- 0.222	0.049	73.34	1.2E-03	Dominio de repetición de anquirina 37
ENSG00000146674	IGFBP3	- 0.204	0.053	22,877.33	3.3E-02	Proteína ligante del factor de crecimiento similar a insulina 3
ENSG00000115524	SF3B1	- 0.203	0.039	11,529.03	1.2E-04	Factor de empalme 3b subunidad1
ENSG00000070614	NDST1	- 0.175	0.036	13,053.04	1.0E-03	N-deacetilasa y N-sulfotransferasa 1
ENSG00000232070	TMEM253	- 0.113	0.028	38.83	1.4E-05	Proteína de transmembrana 253
ENSG00000241370	RPP21	- 0.056	0.019	14.73	5.3E-04	P/MRP de ribonucleasa subunidad p21
ENSG00000282752	CTDP1	- 0.040	0.018	14.79	3.9E-02	CTD fosfatasa subunidad 1
ENSG00000069188	SDK2	- 0.029	0.013	8.71	1.2E-02	Molécula de adhesión celular adyuvante 2

**Tabla 2.** Genes regulados por disminución estadísticamente significativos en células 16HBE tratadas durante 3 horas con *D. rotundifolia* 3X. Para conocer el significado de la leyenda, véase la tabla 1.

#### d) Clasificación de la ontología genética de los genes expresados de forma diferencial

Para comprender mejor las funciones de los genes identificados se realizó un análisis funcional presentando la lista de genes regulados por incremento y por disminución para el análisis del enriquecimiento de la ontología genética (GO, por sus siglas en inglés) utilizando el paquete R/ *Bioconductor gprofiler2*. Los procesos biológicos enriquecidos representativos y los genes asociados con estos procesos se representan en la tabla 3. Los

genes DEG fueron enriquecidos principalmente en procesos biológicos, incluyendo funciones generales como la “regulación de la respuesta al estímulo”, que incluye 34 de los 69 genes, así como actividades biológicas más específicas, como el “desarrollo de la vasculatura” (13 de 69 genes) y una “regulación positiva de la producción del factor de crecimiento endotelial vascular” (5 de 69 genes). Un grupo de 10 genes se asocia con la función de “proliferación de las células epiteliales”.

Término GO	Procesos biológicos	Valor p	n. genes	Genes DEG
GO:0010575	Regulación positiva de la producción del factor de crecimiento endotelial vascular.	8.24E-05	5	<i>CYP1B1, IL1A, HIF1A, ATF4, IL6</i>
GO:0048583	Regulación de la respuesta a estímulos.	0.003206	34	<i>CYP1B1, IL1A, SERPINB2, PPP1R10, EREG, ERFFI1, AREG, EGR1, PPP1R15A, NCOA7, EPGN, DDIT4, HLA-F, IER3, LGR5, GIPR, DYSF, NOG, AJUBA, JUN, UBR5, ARRDC3, CXADR, NLGN2, HIF1A, GPAM, ATF4, LTA, IGFBP3, CTDP1, ADM, BIRC3, CYTH1, IL6</i>
GO:0050673	Proliferación de las células epiteliales.	0.003256	10	<i>EREG, ERFFI1, AREG, EPGN, LGR5, DYSF, NOG, JUN, HIF1A, IGFBP3</i>
GO:0042035	Regulación del proceso biosintético de citocinas.	0.005926	4	<i>IL1A, EREG, ERFFI1, EGR1</i>
GO:1901184	Regulación de la vía de señalización de ERBB.	0.008551	4	<i>EREG, ERFFI1, AREG, EPGN</i>
GO:0001944	Desarrollo de la vasculatura.	0.011299	13	<i>CYP1B1, TIPARP, IL1A, EREG, ERFFI1, EGR1, EPGN, DYSF, NOG, JUN, HIF1A, ADM, IL6</i>
GO:0001819	Regulación positiva de la producción de citocinas.	0.014852	10	<i>CYP1B1, IL1A, EREG, EGR1, HLA-F, HIF1A, ATF4, LTA, BIRC3, IL6</i>
GO:0045931	Regulación positiva del ciclo celular mitótico.	0.017961	5	<i>IL1A, PPP1R10, EREG, EPGN, GEN1</i>
GO:0050678	Regulación de la proliferación celular epitelial.	0.02095	8	<i>EREG, ERFFI1, AREG, EPGN, DYSF, NOG, JUN, HIF1A</i>
GO:0010941	Regulación de la muerte celular.	0.021917	19	<i>CYP1B1, IL1A, SERPINB2, PPP1R10, PHLDA1, EGR1, NCOA7, DDIT4, HLA-F, IER3, NOG, JUN, HIF1A, ATF4, LTA, IGFBP3, ADM, BIRC3, IL6</i>
GO:0001568	Desarrollo de los vasos sanguíneos.	0.038694	12	<i>CYP1B1, TIPARP, IL1A, EREG, EGR1, EPGN, DYSF, NOG, JUN, HIF1A, ADM, IL6</i>
GO:0050679	Regulación positiva de la proliferación de las células epiteliales.	0.049145	6	<i>AREG, EPGN, DYSF, NOG, JUN, HIF1A</i>

**Tabla 3.** Procesos biológicos representativos y genes expresados diferencialmente (DEG) asociados en células 16HBE tratadas con *D. rotundifolia* 3X durante 3 horas. La tabla reporta la identificación de los procesos biológicos enriquecidos (término GO y nombre de proceso biológico), el número de genes expresados de forma diferencial correspondientes a cada proceso biológico y los símbolos de genes correspondientes. Los valores *p* indican la significancia del enriquecimiento obtenida con el algoritmo *g\_SCS* del análisis *gprofiler2*, según se describe en la sección **Materiales y métodos**.

Este conjunto de genes incluye al gen regulado por incremento *LGR5* (una proteína del receptor GPCR y miembro de la vía de señalización Wnt que controla la proliferación celular), el gen regulado por disminución *IGFBP3* (que codifica la proteína de enlace con el factor de crecimiento similar a insulina 3, que ejerce efectos de anti-proliferación en muchos tipos de células) y otros 8 genes con funciones de ontología genética (GO) específicas relacionadas con la regulación epitelial (los ligandos similares al factor de crecimiento epitelial regulados por incremento *EREG* y *EPGN*, el inhibidor *ERRF1* vinculado a EGF regulado por disminución), proteínas involucradas en la reparación de la membrana celular (*DYSF*) o en el desarrollo de los tejidos (*NOG*) y dos factores de transcripción (*HIF1A* y *JUN*).

Un grupo de genes DEG se relaciona con la producción de citocinas, lo que sugiere su posible papel en la inmunidad. Otros procesos que se asocian de forma significativa con los genes objetivo son la “regulación de la muerte celular” y la “regulación positiva del ciclo celular mitótico”, lo que sugiere su

participación en la recuperación del tejido epitelial.

**e) Validación por RT-qPCR de los genes objetivo de *D. rotundifolia* 3X**

Para la validación de la expresión de mRNA, los genes que se asocian con los procesos biológicos enriquecidos e identificados con la secuenciación de ARN, fueron investigados mediante RT-qPCR para validar los efectos de *D. rotundifolia* 3X sobre la expresión de mRNA (tabla 4). Resulta importante que los genes fueron seleccionados principalmente si se asociaban con una función biológica (tabla 3) y posteriormente se aplicaron valores de corte a los genes reportados en las tablas 1 y 2 de la siguiente forma: la proporción de cambio log2 (log2 fold change) >0.1 y < -0.1, media base >100 y transcritos por millón (TPM) > 1 (datos no mostrados). Para muchos genes candidatos, el análisis de su expresión con base en la serie experimental del estudio de la secuenciación de ARN se corroboró mediante la inclusión de los resultados de cuatro nuevos experimentos de seguimiento (para dar un total de 8 muestras independientes).

Gen	n	<i>D. rotundifolia</i> 3X (MNE) (media ± SD)	Ctrl (MNE) (media ± SD)	Log2 fold change	SE	Valor p
<i>TIPARP</i>	4	0.0082±0.0008	0.0041±0.0003	0.982	0.149	0.013
<i>CYP1B1</i>	8	0.0549±0.0044	0.0345±0.0042	0.921	0.069	0.000
<i>SERPINB2</i>	4	0.0004±0.0000	0.0002±0.0000	0.781	0.129	0.026
<i>EREG</i>	8	0.0104±0.0025	0.0084±0.0031	0.574	0.099	0.037
<i>AREG</i>	8	0.0492±0.0109	0.0398±0.0115	0.519	0.225	0.018
<i>EPGN</i>	8	0.0190±0.0041	0.0138±0.0036	0.491	0.157	0.094
<i>IL1A</i>	8	0.0121±0.0014	0.0088±0.0006	0.433	0.077	0.337
<i>CTGF</i>	4	0.0090±0.0006	0.0068±0.0005	0.415	0.121	0.045
<i>PPP1R15A</i>	4	0.0132±0.0015	0.0101±0.0009	0.381	0.162	0.102
<i>CXCL2</i>	4	0.0279±0.0041	0.0214±0.0027	0.362	0.16	0.138
<i>AJUBA</i>	4	0.0187±0.0019	0.0146±0.0006	0.34	0.142	0.125
<i>PHLDA1</i>	8	0.0255±0.0071	0.0205±0.0056	0.331	0.188	0.034
<i>IL6</i>	4	0.0110±0.0010	0.0088±0.0003	0.305	0.092	0.067
<i>EGR1</i>	8	0.0566±0.0090	0.0472±0.0053	0.239	0.174	0.115
<i>CXCL8</i>	4	0.0112±0.0007	0.0097±0.0007	0.222	0.101	0.136
<i>NCOA7</i>	4	0.0034±0.0004	0.0030±0.0002	0.177	0.161	0.342
<i>SASH1</i>	4	0.0029±0.0003	0.0026±0.0003	0.17	0.204	0.446
<i>HBEGF</i>	4	0.0030±0.0004	0.0027±0.0001	0.106	0.095	0.339
<i>DDIT3</i>	4	0.0077±0.0004	0.0076±0.0008	0.03	0.128	0.923
<i>PIK3C2A</i>	4	0.0030±0.0003	0.0029±0.0002	0.028	0.179	0.801
<i>NR2F2</i>	4	0.0482±0.0024	0.0504±0.0067	-0.035	0.144	0.700
<i>IGFBP3</i>	4	0.2175±0.0381	0.2247±0.0377	-0.039	0.138	0.758
<i>IRS2</i>	4	0.0078±0.0003	0.0086±0.0008	-0.123	0.158	0.474
<i>JUN</i>	4	0.0047±0.0006	0.0051±0.0004	-0.14	0.075	0.200
<i>ADM</i>	4	0.0022±0.0002	0.0025±0.0001	-0.214	0.057	0.022
<i>DDIT4</i>	8	0.0386±0.0102	0.0514±0.0160	-0.404	0.248	0.403
<i>SCL2A3</i>	4	0.0093±0.0010	0.0123±0.0010	-0.407	0.176	0.115
<i>ERRF1</i>	8	0.0180±0.0026	0.0234±0.0019	-0.42	0.172	0.006
<i>DEPP1</i>	4	0.0058±0.0004	0.0081±0.0007	-0.478	0.149	0.059
<i>ARRDC3</i>	8	0.0040±0.0009	0.0067±0.0009	-0.757	0.11	0.017

**Tabla 4.** Expresión de mRNA en células 16HBE incubadas con *D. rotundifolia* 3X o el control durante 3 horas. Las células 16HBE fueron cultivadas con *D. rotundifolia* 3X o el control durante 3 horas y su expresión de mRNA de los genes indicados se evaluó mediante RT-qPCR. La expresión de genes se describe como la expresión normalizada media (MNE, por sus siglas en inglés) después de la normalización de mRNA de GAPDH (media ± desviación estándar (SD) del número indicado de experimentos). Los valores p fueron calculados con la prueba t de Student. Los valores en negritas indican el valor p <0.05.

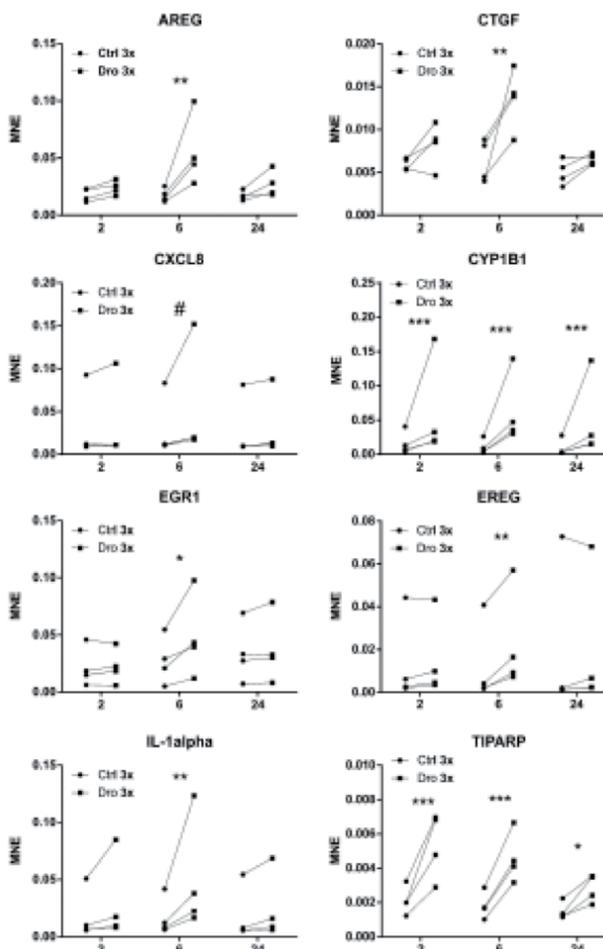
Como se muestra en la tabla 4, RT-qPCR confirmó los cambios significativos en la regulación de 10 genes identificados con el análisis de la secuenciación de ARN. El resto de los genes investigados mostraron cambios similares a aquellos revelados por la secuenciación de ARN (véanse las tablas 1, 2), los cuales no fueron estadísticamente significativos. Es destacable que los cambios en la expresión diferencial en los genes correspondientes asociados con los procesos biológicos enriquecidos, tales como *CY1B1*, *EREG*, *AREG*, *CTGF* y *ERR1F1*, fueron verificados mediante RT-qPCR en nuevos experimentos de seguimiento realizados con células tratadas durante 3 horas con *D. rotundifolia* 3X.

#### f) Evolución temporal del efecto de *D. rotundifolia* 3X

Se seleccionaron algunos genes representativos y muy bien expresados para investigar la cinética de los efectos de *D. rotundifolia* 3X durante la evolución temporal del tratamiento celular. Se realizó una nueva serie de cuatro experimentos, en donde las células se incubaron durante 2 horas, 6 horas y

24 horas con el medicamento o el control. La figura 2 muestra la expresión de mRNA de *AREG*, *CTGF*, *CXCL8*, *CYP1B1*, *EGR1*, *EREG*, *IL-1 $\alpha$*  y *TIPARP* en células con y sin *D. rotundifolia* 3X en los momentos indicados. Los resultados de los cuatro experimentos se muestran por separado, dado que uno de los experimentos produjo niveles más altos de expresión de mRNA para unos cuantos genes (por ejemplo, *CXCL8*, *EREG* y *IL-1 $\alpha$* ).

A pesar de la heterogeneidad en la expresión genética basal, la dirección del efecto es clara y definida y es en gran parte significativa para al menos uno de los puntos temporales con base en la estadística para los datos pareados. Los experimentos mostraron que el efecto de *D. rotundifolia* 3X sobre la mayor parte de los genes ya ha comenzado a las dos horas, se expresa en un grado mayor después de 6 horas, en tanto que se reduce a las 24 horas. *CYP1B1* y *TIPARP* son excepciones para esta tendencia, en tanto que éstos mostraron la máxima actividad a las 2 horas, la cual disminuyó a las 6 horas y se redujo aún más a las 24 horas.



**Figura 2.** Cinética de la expresión de mRNA de *AREG*, *CTGF*, *CXCL8*, *CYP1B1*, *EGR1*, *EREG*, *IL-1 $\alpha$*  y *TIPARP* en células 16HBE incubadas con *D. rotundifolia* 3X. Las células 16HBE se cultivaron con *D. rotundifolia* 3X (Dro 3X) o Ctrl (Ctrl 3X) hasta por 24 horas, para evaluar la expresión de mRNA mediante RT-qPCR. La expresión de los genes se describe como la expresión normalizada media (MNE) después de la normalización de mRNA de *GAPDH* (n = 4). Los asteriscos indican un incremento significativo: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p = 0.057$  mediante ANOVA bidireccional seguida por una prueba posterior de Bonferroni.

Con base en estos resultados, se realizó un nuevo análisis de la secuenciación de ARN de las muestras incubadas durante 6 horas con *D. rotundifolia* 3X para describir con detalle y bajo las mejores condiciones todos los efectos de la planta sobre la transcripción genética de las células bronquiales.

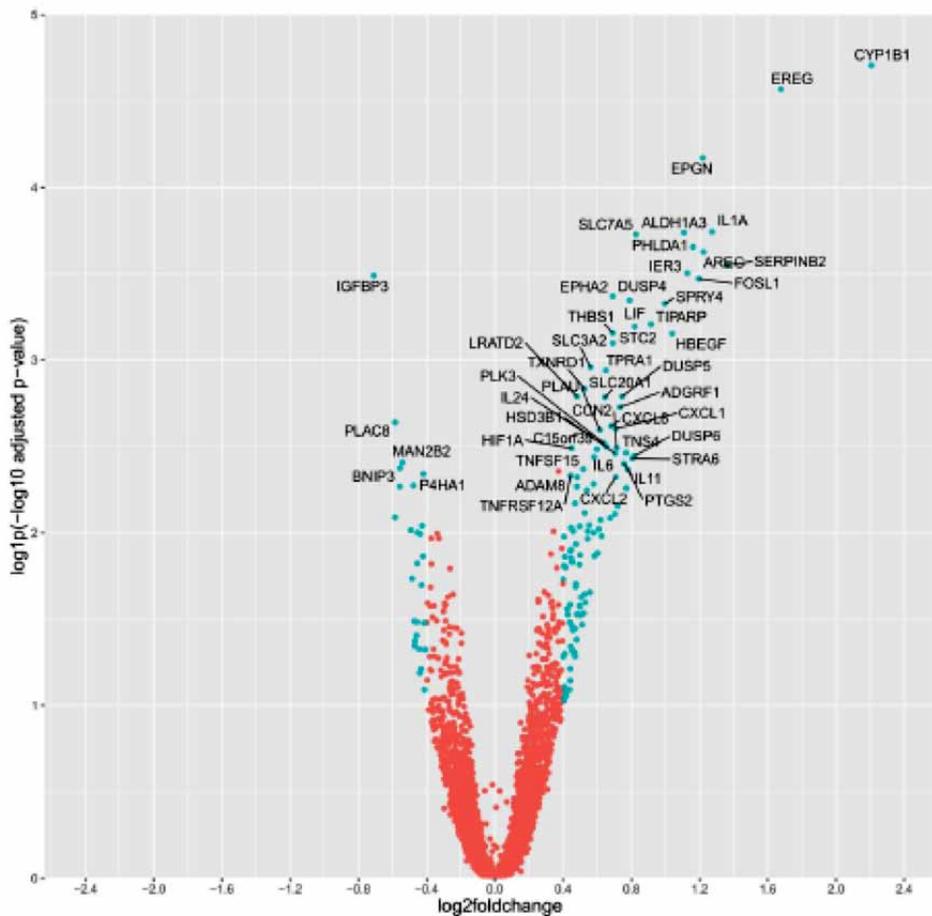
**g) Secuenciación de ARN de células 16HBE tratadas con *D. rotundifolia* 3X durante 6 horas**

La secuenciación de ARN se realizó utilizando los mismos parámetros usados para la secuenciación de ARN de las células 16HBE tratadas con *D. rotundifolia* 3X durante 3 horas, así como el análisis bioinformático. Todas las muestras pasaron las pruebas de control de calidad descritas para la secuenciación de ARN de las muestras tratadas durante 3 horas.

El resultado de DESeq2 generó una lista de 495 genes DEG en células 16HBE después de 6 horas de tratamiento con *D. rotundifolia* 3X, en comparación con el tratamiento con el control (padj <0.05), que contiene en su mayor parte genes regulados por incremento (n = 334). La Figura 3

describe los genes DEG en una gráfica de volcán, la cual resalta (puntos azules) todos los genes (n = 117) que sufrieron un cambio estadísticamente significativo (valor *p* ajustado <0.05) y un valor de proporción de cambio log2 (log2 fold change) superior a +0.4 ó inferior a -0.4. Para este análisis, se utilizó un valor de corte de proporción de cambio log2 (log2 fold change), dado que el número de genes DEG fue mucho más alto, en comparación con aquel identificado mediante la secuenciación de ARN realizada para el tratamiento de 3 horas.

La figura 3 muestra que, después de 6 horas de incubación, hubo un alto número de genes DEG, especialmente genes regulados por incremento, lo cual coincide con aquello que se muestra en la figura 2. Desde un punto de vista cualitativo, se observa una similitud en los genes cuya expresión se incrementa en dos momentos de incubación distintos. Tal similitud se ve reflejada en la regulación por incremento de algunos genes, como *CYP1B1*, *EPGN*, *EREG*, *SERPINB2*, *IL-1α*, *AREG* y *PHDLA1*, los cuales también fueron regulados por incremento por células tratadas con *D. rotundifolia* 3X durante 3 horas (véase la tabla 1).



**Figura 3.** Gráfica de volcán del análisis de la expresión diferencial de células 16HBE tratadas con *D. rotundifolia* 3X durante 6 horas. Los puntos dispersos representan a los genes: el eje es proporción de cambio log2 (log2 fold change) para células 16HBE tratadas con *D. rotundifolia* 3X. El eje y muestra log1p (-log10 de valor *p* ajustado), que enfatiza mejor los genes expresados de forma diferencial en nuestras condiciones experimentales. Los puntos azules representan los genes que se expresaron diferencialmente de forma significativa (valor *p* ajustado < 0.05) con una proporción de cambio log2 (log2 fold change) < -0.4 ó >0.4 después de un tratamiento de 6 horas con *D. rotundifolia* 3X. **Adjusted p-value = Valor *p* ajustado.**

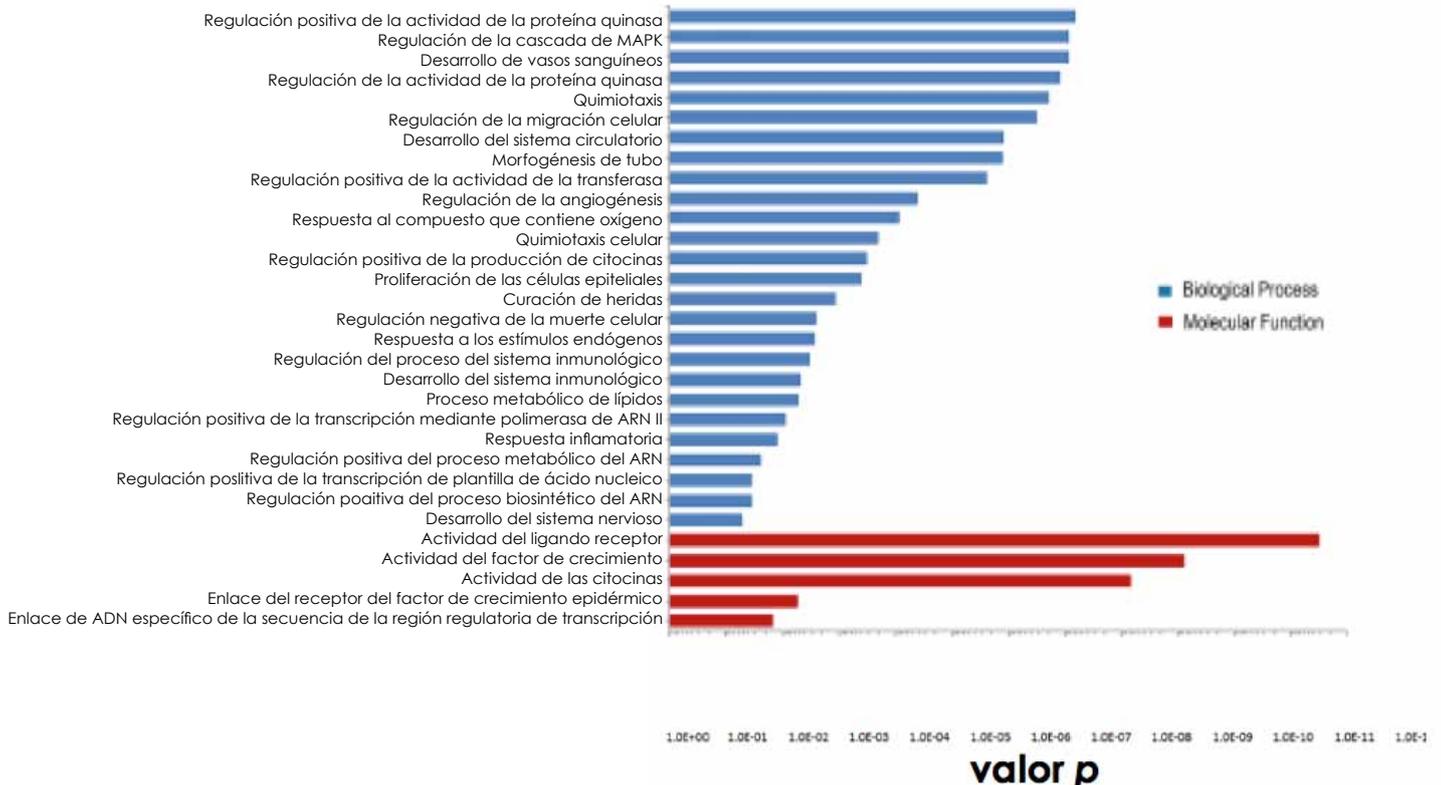
En relación con los genes regulados por disminución (lado izquierdo de la figura 3), se resaltan algunos genes nuevos asociados con un efecto inhibitor, incluyendo a *IGFBP3*, *PLAC8*, *MAN2B2* y *BNIP3* que, con excepción de *IGFBP3*, fueron identificados tan sólo después de 6 horas de incubación y no después de una exposición menos prolongada (2 o 3 horas). Además, no se encontró que los genes que fueron ligeramente regulados por disminución después de 3 horas de tratamiento con *D. rotundifolia* 3X, como *ERRF1*, se regularan después de 6 horas de tratamiento.

### h) Análisis funcional

Los 117 genes expresados de forma diferencial fueron clasificados según la significancia del valor *p* ajustado, mientras que se realizó el análisis de enriquecimiento de GO usando *gprofiler2*, según se describe en la sección de **Materiales y métodos**. Los resultados del enriquecimiento para el conjunto

de datos de 6 horas (figura 4) muestran un amplio rango de información concerniente a los procesos biológicos (barras azules en la figura 4) y las funciones moleculares (barras rojas). Se observaron procesos biológicos enriquecidos similares después de 6 horas y 3 horas de tratamiento con *D. rotundifolia* 3X, como funciones relacionadas con el desarrollo de los vasos sanguíneos, regulación de la proliferación de las células epiteliales y producción de citocinas.

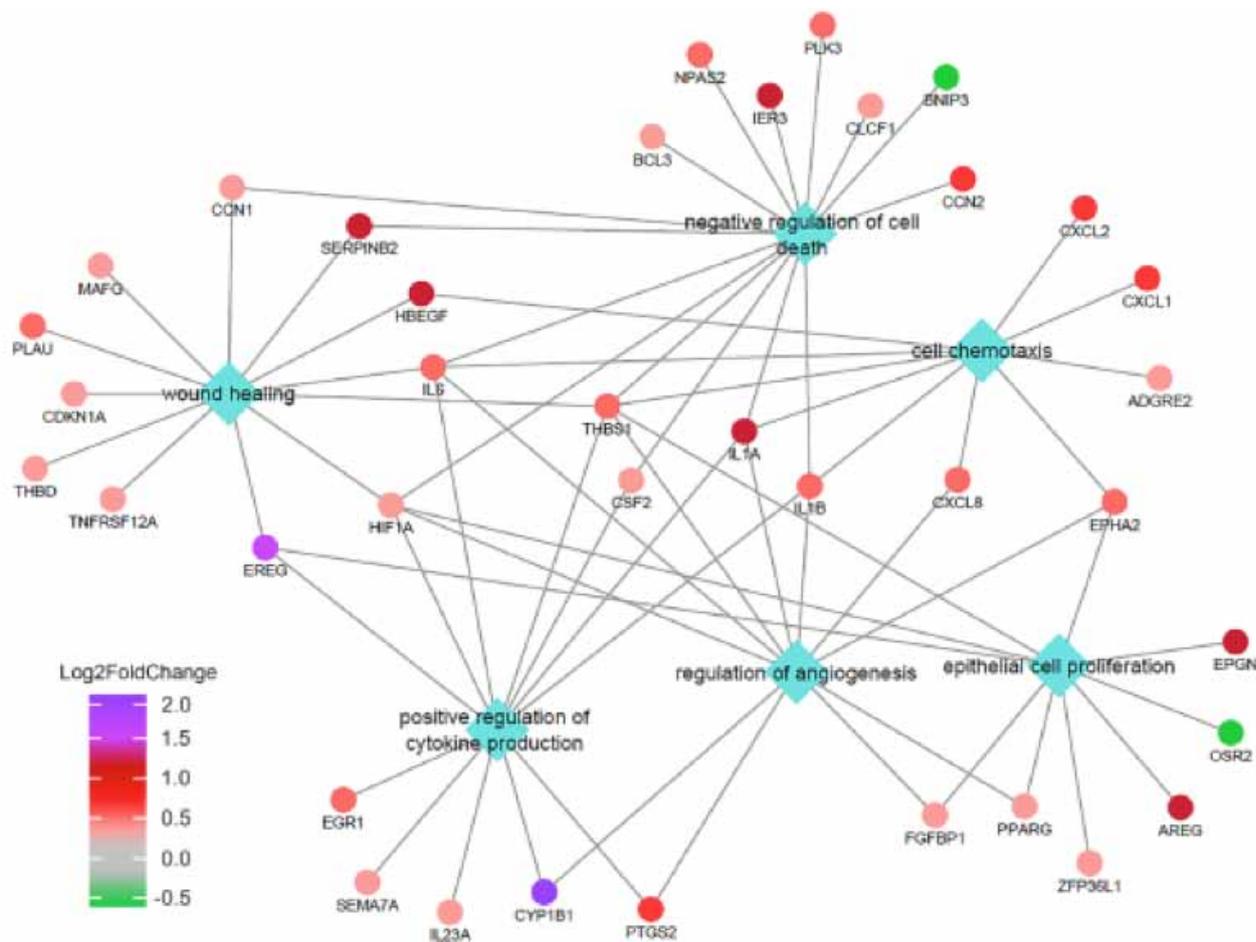
Además, hubo un incremento en los procesos biológicos relacionados con la inflamación y quimiotaxis después de 6 horas de tratamiento con *D. rotundifolia* 3X debido a la regulación por incremento de citocinas y quimiocinas adicionales. Estos datos confirman que hay un incremento en los efectos y sugieren nuevas funciones asociadas con el tratamiento con *D. rotundifolia* 3X de células 16HBE después de 6 horas.



**Figura 4.** Clasificaciones de ontología genética representativas de los genes expresados de forma diferencial en células 16HBE tratadas con *D. rotundifolia* 3X. Los genes expresados de forma diferencial se clasificaron en dos categorías: Procesos biológicos y funciones moleculares. Se realizó el análisis del enriquecimiento de la ontología genética utilizando la función "gost" del paquete *gprofiler2* de conformidad con la lista de genes clasificada conforme al valor *p* ajustado. Los términos de ontología genética (GO) con valores *p* < 0.05 se consideraron significativos.

Para crear una imagen funcional de las funciones enriquecidas y sus correlaciones se construyó una red que asocia los genes con las funciones en el modelo biológico de las células epiteliales bronquiales (figura 5). Las funciones son representativas y se seleccionaron con base en nuestro modelo experimental y valor *p* de enriquecimiento. Los valores de la proporción de cambio log2 (log2 fold change) del resultado de DESeq2 se describen con nodos de color, lo cual muestra que el enriquecimiento de estas funciones

biológicas se asocia en su mayor parte con los genes regulados por incremento. Esto era lo esperado, dado que el número de genes regulados por incremento observados después del tratamiento con **D. rotundifolia** 3X fue casi 3 veces mayor al número de genes regulados por disminución. Además, los genes que fueron regulados por incremento mediante **D. rotundifolia** 3X se asocian con muchos procesos biológicos, aunque éste no fue el caso para los genes regulados por disminución.



**Figura 5.** Red funcional de procesos biológicos enriquecidos y genes asociados. La red se construyó usando los términos de ontología genética (GO) significativos seleccionados que se muestran en la **figura 4**, que fueron cargados en el software *Cytoscape*, según se describe en la sección **Materiales y métodos**. Los diamantes indican procesos biológicos, mientras que los círculos indican los genes asociados.

- Negative regulation of cell death** = Regulación negativa de la muerte celular.
- Wound healing** = Curación de heridas.
- Cell chemotaxis** = Quimiotaxis celular.
- Positive regulation of cytokine production** = Regulación positiva de la producción de citosinas.
- Regulation of angiogenesis** = Regulación de la angiogénesis.
- Epithelial cell proliferation** = Proliferación de las células epiteliales.

## Discusión

En el presente estudio se realizó investigación genómica funcional para explorar los efectos de una planta medicinal utilizada tradicionalmente para las enfermedades respiratorias sobre sus células objetivo potenciales *in vitro*, es decir, las células epiteliales bronquiales. Este estudio muestra que un extracto herbolario diluido utilizado en una farmacopea homeopática tradicional<sup>5, 9-12</sup> puede inducir un cambio en la expresión de mRNA que puede medirse de forma confiable y reproducible. Actualmente se investigan dosis bajas de plantas tradicionales y diluciones homeopáticas por medio de técnicas de biología molecular para la bioinformática y análisis de la expresión diferencial de genes<sup>24-28</sup>.

El monitoreo en las células bronquiales con análisis de la secuenciación de ARN mostró que cantidades bajas de **D. rotundifolia** en una dilución de 3X, que representa una dosis utilizada comúnmente en los jarabes fitoterapéuticos y homeopáticos, cambiaron la expresión de docenas de genes después de 3 horas; y este efecto se amplificó después de 6 horas de tratamiento. La validación con RT-qPCR confirmó la expresión diferencial de los genes de interés y mostró que, después de 6 horas de tratamiento con **D. rotundifolia** 3X, hubo un incremento en la expresión de mRNA. Dado que la sensibilidad de RT-qPCR es mayor a aquella de la secuenciación de ARN, tales resultados sustentan los hallazgos del análisis de la secuenciación de ARN, lo que sugiere que puede darse seguimiento al tratamiento con **D. rotundifolia** 3X con la investigación de la expresión de estos genes.

En nuestros experimentos, **D. rotundifolia** 3X no afectó la adherencia o viabilidad celular, lo que sugiere que la dilución es segura cuando se somete a prueba de forma directa en el cultivo celular. La misma dilución ejerció un efecto estimulante sobre la expresión de varios genes, incluyendo aquellos de las citocinas inflamatorias. Además, el análisis transcriptómico y la confirmación de RT-qPCR sugieren que, con la dilución utilizada, **D. rotundifolia** 3X funciona principalmente como un estimulante y no como un inhibidor de las funciones celulares. Este resultado es distinto a los datos reportados por otros en los mastocitos humanos HMC-129, que sugieren efectos anti-inflamatorios de la planta. Esta aparente discrepancia podría deberse a la diferencia en el modelo biológico, dado que los mastocitos son células inflamatorias típicas y fueron estimuladas antes del tratamiento con **D. rotundifolia**, mientras

que nuestras células epiteliales fueron tratadas sin estímulos inflamatorios previos. Sin embargo, de forma aún más importante, pueden usarse distintas dosis: Fukushima *et al.*<sup>29</sup> obtuvieron un efecto inhibidor usando fracciones no diluidas del extracto completo de *D. rotundifolia* mientras que, en el presente estudio, las células fueron tratadas con una dilución de 3X (1000 veces) del extracto etanólico.

Paper *et al.*<sup>30</sup> reportaron que los extractos de *D. rotundifolia* y otras especies, sometidos a prueba en el modelo de huevo de gallina, muestran eficacia como agentes antiinflamatorios, antiespasmódicos y antiangiogénicos. En contraste con ello, los datos de nuestro estudio sugieren que el tratamiento con **D. rotundifolia** 3X puede disparar una respuesta inflamatoria leve en las células 16HBE. Este último efecto puede ser atribuido al incremento en la expresión de mRNA de citocinas pro-inflamatorias como *IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  y *IL-6* y quimiocinas como *CXCL1*, *CXCL2* y *CXCL8*.

Las discrepancias en los datos de Paper *et al.*<sup>30</sup> podrían deberse a que los modelos son distintos o, de nuevo, a las dosis aplicadas, dado que utilizamos una dilución homeopática del extracto de la planta, que representa un estímulo biológico y no inhibe las funciones celulares clave<sup>24</sup>, como los agentes antiinflamatorios convencionales. Además, se sabe bien que una leve respuesta inflamatoria podría ser benéfica para el sistema inmunológico mediante el incremento de la apoptosis y depuración de las células inflamatorias<sup>31, 32</sup>.

Este concepto es completamente concordante con la teoría y tradición homeopáticas, en donde bajas dosis de sustancias patogénicas y/o estímulos mínimamente estresantes disparan respuestas endógenas de “energía vital” que, en última instancia, conducen a la curación a nivel celular, tisular o sistémico<sup>33-35</sup>. La presencia de *CXCL1*, *CXCL2* y *CXCL8*, que son en su mayor parte quimioatrayentes de neutrófilos, sugiere que el tratamiento con **D. rotundifolia** 3X puede ayudar a establecer una barrera inmunológica lista para actuar contra patógenos en caso de daño del tejido epitelial bronquial<sup>36</sup>.

Resulta interesante que el tratamiento con **D. rotundifolia** 3X incrementó la expresión de los factores de crecimiento epidérmico específicos, como *AREG*, *EREG* y *EPGN*, a través de las células 16HBE. La regulación por incremento de estos factores sugiere que **D. rotundifolia** 3X desempeña un papel positivo en la regulación de la supervivencia celular, la proliferación celular y la curación de heridas.

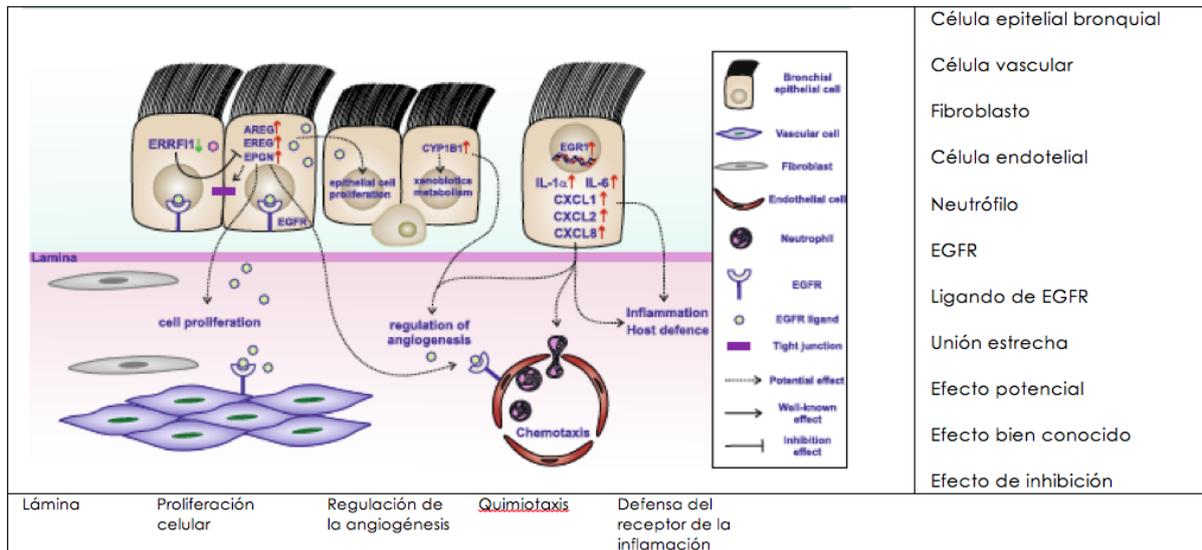
Además, todos estos factores se ligan con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para cumplir con sus funciones. En este contexto, EGFR se expresa ampliamente en las células presentes en el ambiente bronquial, lo que sugiere que la posible liberación de estos factores de crecimiento no sólo afecta la proliferación de las células epiteliales bronquiales, sino también aquella de las células endoteliales, los fibroblastos y las células vasculares. En el caso del daño al tejido epitelial bronquial, **D. rotundifolia** 3X pudo contribuir a una curación más rápida del microambiente bronquial.

*CYP1B1* fue el gen más altamente expresado después del tratamiento con **D. rotundifolia** 3X en ambos puntos temporales mostrados en este estudio. *CYP1B1* probablemente se activa como respuesta al tratamiento con **D. rotundifolia** 3X, dado que *CYP1B1* pertenece a la familia del citocromo y se encuentra involucrado en el metabolismo de los xenobióticos. Además, como se muestra en la figura 5, *CYP1B1* se relaciona con la regulación de la angiogénesis y la regulación positiva de la producción de citocinas debido a su papel como un antioxidante y regulador de NF-κB<sup>37, 38</sup>, respectivamente.

El presente estudio tiene algunas limitaciones, dado que se requiere de algunos de los hallazgos se basen en el análisis bioinformático, la expresión de mRNA y los experimentos funcionales para verificar los mecanismos de acción y los efectos

del tratamiento con **D. rotundifolia** 3X. Además, es importante observar que, después de 6 horas de tratamiento con **D. rotundifolia** 3X, hubo una serie de genes expresados de forma diferencial con valores de proporción de cambio log2 (log2 fold change) que oscilaban entre +0.4 y -0.4, los cuales no fueron incluidos en el análisis para la elaboración del presente documento, pero podrían ser considerados para un estudio futuro. De hecho, los efectos sobre la regulación genética representan únicamente un primer paso funcional de la acción de la planta que hemos resaltado y nuestras hipótesis deberán ser confirmadas con estudios adecuados realizados en animales de laboratorio para investigar el potencial terapéutico y los mecanismos de acción de esta planta.

En conclusión, los datos ponen de manifiesto la compleja y multifacética acción de la planta sobre las distintas capas de la mucosa bronquial, como se resume en la figura 6. Los cambios en la expresión de mRNA en células 16HBE tratadas con **D. rotundifolia** 3X sugieren su acción directa sobre la célula epitelial, que protege su integridad con respecto a sustancias tóxicas (*CYP1B1*) y estimula su capacidad de reparación (*AREG*, *EREG* y *EPGN*). Además, las células epiteliales transmiten señales moleculares que activan una inflamación leve (citocinas pro-inflamatorias) y reclutan células asociadas con la angiogénesis y defensa innata.



**Figura 6.** Gráfico ilustrativo que resume los efectos potenciales de **D. rotundifolia** 3X sobre las células epiteliales bronquiales. La presencia de **D. rotundifolia** 3X induce la expresión de factores de crecimiento epidérmico (*AREG*, *EREG* y *EPGN*), lo cual conduce al crecimiento/reparación de las células epiteliales bronquiales y otras células en el ambiente bronquial. Tales genes, los cuales se enlazan con EGFR para lograr sus funciones, son regulados por *ERFF11* que, a su vez, es regulado por disminución por **D. rotundifolia** 3X en las primeras 3 horas. *CYP1B1* presenta una alta expresión y se relaciona con el metabolismo de los xenobióticos y podría encontrarse involucrado en la regulación de la angiogénesis. Adicionalmente, las citocinas inflamatorias (*IL-1α* y *IL-6*) y las quimiocinas (*CXCL1*, *CXCL2* y *CXCL8*) son inducidas por **D. rotundifolia** 3X y pueden disparar una leve inflamación, incrementando la quimiotaxis y la angiogénesis, ayudando al sistema a combatir las infecciones.

## Materiales y métodos

### a) Preparación de las muestras de *D. rotundifolia*

La planta original de drosera de hoja redondeada, identificada con el nombre botánico de *Drosera rotundifolia*, fue adquirida de forma comercial (Monteagle Herbs, ON, Canadá; documento de autenticidad #42808). Hasta donde sabemos, no han surgido cuestiones relacionadas con la Convención sobre Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora. La *Drosera rotundifolia* fue preparada (extracto etanólico) por Standard Homeopathic Company, CA, Estados Unidos. El extracto contenía 1 g de la planta entera seca macerada en 10 mL de EtOH al 45%, que corresponde a *D. rotundifolia* 1X. Antes de los experimentos, se diluyó de forma serial extracto etanólico de *D. rotundifolia* 1X 1:10 (0.5 mL + 4.5 mL) dos veces en agua estéril sin pirógenos (B-Braun, Melsungen, Alemania) en un tubo de vidrio limpio de 14 mL, que fue inmediatamente agitado de forma vigorosa (sometido a succusión) con un agitador mecánico Dyna A que realizó 20 sacudidas/s durante 7.5 s con una distancia de recorrido de 11. La solución final corresponde a una dilución de 3X en solución de etanol al 0.45%. La solución de control se preparó comenzando con solución recién preparada de etanol al 45% (AppliChem, Darmstadt, Alemania) y se sometió a succusión según se ha descrito previamente. Ésta se consideró la solución de control 1X. Se aplicaron dos diluciones/sucusiones decimales en serie en agua ultrapura, según se reporta anteriormente, para obtener la dilución de control 3X (Ctrl). No se realizó filtración alguna en ninguno de los pasos. Estas soluciones se utilizaron en los medios de cultivo en una proporción de 1:10 (0.1 mL de solución de prueba en 0.9 mL de medio de cultivo). Por lo tanto, la dilución final de *D. rotundifolia* fue 1000 veces mayor a aquella del extracto etanólico y la concentración de etanol fue de 0.045%.

### b) Cuantificación fenólica

El contenido fenólico total del extracto etanólico de *D. rotundifolia* se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu<sup>39</sup>. En breve, 50 µL de extracto a una dilución apropiada fueron mezclados con 155 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 v/v con agua. Después de 1 minuto, se añadieron 40 µL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% y las muestras fueron incubadas durante 30 minutos en la oscuridad a 37 °C. La absorbancia de cada muestra se midió a 765 nm. Se usó ácido gálico como estándar para la curva de calibración, mientras que el contenido fenólico se expresó como equivalentes de ácido gálico. Cada determinación fue repetida tres veces y los resultados

se expresan como media ± desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés).

### c) Espectrometría de masa

Se utilizó una serie 1260 HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) en tándem con un espectrómetro de masa Q-TOF para el presente estudio. La separación se realizó en Zorbax Eclipse XDB (2.1 x 150 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Agilent Technologies) con elución de gradiente. El ácido fórmico (0.1%) fue el solvente A, mientras que el metanol fue el solvente B. El caudal fue de 500 µL/min. Se utilizó un volumen de inyección de 5 µL en todos los experimentos. Las muestras fueron sometidas a elución con un gradiente lineal de 20 a 95% del solvente B.

El análisis de espectrometría de masa (MS, por sus siglas en inglés) se realizó usando un modelo Q-TOF LC/MS de Masa Exacta 6540 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos) en línea con la HPLC. QTOF-MS se implementó con una fuente de ionización por electroaspersión con tecnología de Chorro a Presión de Agilent que opera en modo de ionización negativa. La adquisición de datos se realizó en modo de escaneo completo en el rango de masa de 100–1000 m/z<sup>40</sup>. Los estándares utilizados fueron quercetina, ácido elágico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos), isoquercitrina e hiperósido (HWi, Ruelzheim, Alemania).

### d) Tratamiento celular

Se hicieron crecer células epiteliales bronquiales humanas 16HBE (línea 16HBE140-, que amablemente fue suministrada por el Dr. Gruenert, Universidad de California, San Francisco) durante 1 semana en medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés) suplementado con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) al 10% (incluyendo 2 mM de UltraGlutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina) de muestras congeladas criogénicamente (2 x 10<sup>6</sup> células/vial) preparadas a partir del cultivo del lote (P14, decimocuarto pasaje de cultivo desde el cultivo original). Se utilizaron matraces revestidos de albúmina de suero bovino BSA/colágeno/fibronectina<sup>41</sup>. El medio de cultivo se reemplazó cada 3 días. Antes del tratamiento, en el día 1, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos (sin tapar) con una densidad de 0.4 x 10<sup>6</sup> células/pocillo en medio EMEM con FBS al 2% (incluyendo 2 mM de UltraGlutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina).

Las placas fueron incubadas hasta que ocurrió la completa adhesión de las células (16–20 horas). En el día 2, el medio de cultivo se reemplazó

con 0.9 mL de EMEM recién preparado con FBS al 2%. Se añadió **D. rotundifolia** 3X o Ctrl (0.1 mL/pocillo). Las placas fueron incubadas durante 2, 3, 6 o 24 horas, dependiendo de cada escenario experimental. El volumen final fue de 1 mL/pocillo. Los cultivos celulares de Ctrl fueron realizados en paralelo con aquellos tratados con **D. rotundifolia** durante los tiempos indicados en las mismas placas de cultivo. Después de periodo de incubación deseado, las células 16HBE tratadas y de Ctrl fueron recolectadas y sometidas a la extracción de ARN.

#### e) Evaluación de la viabilidad celular

La viabilidad celular fue revisada con el reactivo de proliferación celular WST-1 (Gibco ThermoFisher Scientific). El ensayo WST evalúa las actividades metabólicas celulares (NADH reductasa) midiendo la modificación química de la sal de tetrazolio de WST. Se sembraron células 16HBE con una densidad de 50,000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se sometieron a tratamiento durante 3 o 24 horas con las soluciones de **D. rotundifolia** 3X o de Ctrl, que se añadieron al cultivo celular con una proporción de volumen de 1/10. Después del tratamiento, se añadió solución WST-1 precalentada 1:10 (v/v) a las células y la placa fue incubada durante 90 minutos. La absorbancia (OD) de las muestras se midió usando un lector múltiple Victor3 (PerkinElmer, Shelton, CT, Estados Unidos) a 450 nm. Los datos de la viabilidad celular fueron evaluados mediante estadística de la prueba t (**D. rotundifolia** 3X vs. Ctrl).

#### f) Extracción de ARN

El ARN total de las células 16HBE cultivadas se aisló usando el mini Kit RNeasy (Qiagen, Venlo, Limburg, Países Bajos) de conformidad con las instrucciones del fabricante. También se realizó una digestión DNase en la columna con el kit DNase sin RNase (Qiagen) durante el aislamiento de ARN total para eliminar por completo cualquier posible ADN contaminante. La cantidad y calidad del ARN fueron determinadas usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos)<sup>42</sup>.

#### g) Secuenciación de ARN (RNA-seq)

Se procesaron muestras de ARN en la Unidad Genómica y Transcriptómica del Centro de Plataformas Tecnológicas (Universidad de Verona, Italia). Se evaluó el ARN total de las células 16HBE en relación con la calidad (integridad) usando un Nano Kit RNA 6000 (Agilent, Wokingham, Reino Unido). Las muestras con números de integridad de ARNA > 9 se consideraron adecuadas para la preparación de librerías. Las alícuotas de ARN (2.5 µg) se utilizaron

para aislar poli(A) mARN para la preparación de una librería direccional de Secuenciación de ARN Illumina usando el Kit de Preparación de Librería de mARN Illumina TruSeq Stranded (Illumina Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

La calidad de la librería antes de la generación de los grupos fue revisada a través de la visualización de los fragmentos de ADN en el sistema de electroforesis miniaturizado Tape Station (Agilent D1000 sistema Screen Tape). Los tamaños de los insertos promedio se encontraron en el rango de 300–370 bp. Las librerías también fueron cuantificadas mediante qPCR utilizando el kit de Cuantificación de Librerías KAPA (Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, Estados Unidos). Las librerías (etiquetadas de forma diferencial) fueron conjuntadas en cantidades iguales antes de la secuenciación. La secuenciación se realizó con un Illumina NextSeq 500 (Illumina, CA, Estados Unidos). Las muestras fueron secuenciadas con un protocolo de variable única (75 pares de base) con una profundidad de secuenciación de aproximadamente 30 lecturas M para la muestra. Después de la secuenciación, el Reporte de Control de Calidad (QC, por sus siglas en inglés) de Secuencia, FastQC de Rendimientos Elevado (Versión 0.11.8) se utilizó para evaluar la calidad de la secuenciación con base en los archivos FASTQ.

La cuantificación del transcripto se realizó con el servidor de cómputo de alto desempeño en la Unidad Informática del Centro de Plataformas Tecnológicas (Universidad de Verona, Italia). La cuantificación del transcripto se determinó a partir de las lecturas FASTQ utilizando el modo a base de mapeo de Salmon (Versión 0.13.1)<sup>43</sup> con los siguientes parámetros: “-i index -l SR -r name -validateMappings -gcBias”. Los archivos de anotación y la secuencia de referencia fueron descargados del repositorio GENCODE (Human Release 32, GRCh38.p13) en el siguiente sitio electrónico: <https://www.encodegenes.org/human/>. El resultado de Salmon se importó al ambiente de RStudio (Versión R 3.5.3; versión de estudio R 1.1.463) usando el paquete *R/Bioconductor tximport* (versión 1.10.10)<sup>44</sup>, que convirtió los datos del nivel de transcripto al nivel genético durante el proceso de importación. Los genes con menos de 10 lecturas fueron descartados a partir del análisis posterior. Se realizó el análisis de la expresión diferencial usando el paquete *R/Bioconductor DESeq2* (versión 1.22.2)<sup>45</sup>. Después del análisis diferencial, la función *lfcShrink* en *DESeq2* se aplicó para reducir la proporción de cambio log2 (log2 fold change). Los

valores de significancia se basaron en una prueba de significancia de Wald, mientras que las diferencias en la expresión genética con un valor *p* ajustado <0.05 (corregido mediante el método de Benjamini-Hochberg) fueron consideradas significativas. Para el análisis de la secuenciación de ARN de los experimentos, en donde las células fueron tratadas durante 6 horas con **D. rotundifolia** 3X, se aplicó un valor de corte de proporción de cambio log2 (log2 fold change) (<0.4 y >0.4). Para asociar una función con los genes expresados de forma diferencial, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional usando el paquete *R/Bioconductor gprofiler2* (versión 0.1.7)<sup>46</sup>. Los genes expresados diferencialmente fueron ordenados según la significancia del valor *p* ajustado y el análisis de la ontología genética (GO) fue realizado utilizando la función “gost” en *gprofiler2* en el modo “ordenado” y “g\_SCS” como método estadístico/de corrección. La lista de términos de ontología genética (GO) significativos se utilizó para el desarrollo de la red usando el software *Cytoscape* (versión 3.7.2)<sup>47</sup>.

**h) PCR en tiempo real cuantitativo de transcripción inversa (RT-qPCR)**

El ARN total extraído de células 16HBE se transcribió de forma inversa en cADN utilizando el Kit de reactivos PrimeScript RT (Takara Bio, Kusatsu, Japón), mientras que qPCR fue realizado usando TB Green Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus) (Takara Bio)<sup>42</sup>. Las secuencias de iniciadores específicos de genes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) utilizadas en el presente estudio se enumeran en la tabla 5. qPCR se realizó utilizando un sistema de PCR en tiempo real Viia7 (Thermo Fisher Scientific). Los datos fueron calculados con el software Q-Gene (<http://www.gene-quantification.de/download.html>) y se expresaron como unidades de expresión normalizada media (MNE) después de la normalización de *GAPDH*<sup>42</sup>. La evaluación estadística se realizó mediante ANOVA bidireccional, seguida de la prueba *post hoc* de Bonferroni. Los valores de *p* <0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Gen	Avance	Retroceso
ADM	AAGTACTTGGCAGATCACTCTC	CCCCTTATTCCACTTCTTTTCG
AJUBA	CTTTCTACAGTGCAATGGCTC	CATTGCTTGTAGGATCTTCTCCA
AREG	GAGCCGACTATGACTACTCAG	CTTAACTACCTGTTCAACTCTGAC
ARRDC3	GTTTATCACTTCTGAAAGACCTG	CTCTCAAAGTCATCACAAGCAC
CTGF	CCCAGACCCAATATGATTAGAG	CTCCACAGAATTAGCTCGGT
CXCL2	TTTATTTATTGTTTGTGTTTAGAAG	CTAACTGGGTTTGACCTAAAAT
CXCL8	AGAGACAGCAGAGCACACAAG	ACACAGTGAGATGGTTCCTTC
CYP1B1	CTGGATTTGGAGAACGTACCG	TCAGGATACCTGGTGAAGAGGA
DDIT3	AGTCATTGCCTTCTCCTTCG	TGATTCTTCTCTTCATTCCAGG
DDIT4	GAGGAAGACACGGCTTACCT	CAGTAGTTCTTGGCCACCT
DEPP1	CTCATCCATTCTCCTGCCAC	GTGCCAGTCGAGATATAGACC
EGR1	AGCAGCAGCACCTTCAACC	GCAGGCTCCAGGGAAAAG
EPGN	ATTCACGCAATGACAGCAC	GCTATGGGTCCTTCTATGTTGTC
EREG	ACAGCTTTAGTTCAGACAGAAGAC	GCAAACAATAGCCATTCTATGTCAG
ERRFI1	CTAATACCCTTGGGCATGCT	AACTTGATCCTCTTCATGTGGTC
GAPDH	AACAGCCTCAAGATCATCAGC	GGATGATGTTCTGGAGAGCC
HBEGF	CTCATGTTTAGGTACCATAGGAG	CAGTCTGAAATCACCTTGTGTC
IGFBP3	ACACTGAATCACCTGAAGTTCC	AGCTCCACATTAACCTTGCG
IL1A	AGAGAGGGAGTCATTTCTTGG	ACTCAGAGACACAGATTGATCC
IL6	GGCACTGGCAGAAAACAACC	GCAAGTCTCCTCATTGAATCC
IRS2	CATCGTGAAGAGTGAAGATCTG	AAACAGCACAATGATGAATGCC
JUN	ACCTTATGGCTACAGTAACCC	TTGCTGGACTGGATTATCAGG
NCOA7	GAAGAAGATGGTGGTTCAGAAG	TCAGTGCTATGGAGTTTAGGG
NR2F2	GTTCACCTCAGATGCCTGTG	CAGTAACATATCCCGGATGAGG
PHLDA1	ATCCACATCCACACTCTCATC	CTTCTCAAGTCTCAAACC
PIK3C2A	AGACTCTTGCCATTACAGAATCAG	CTCCAAACAAGAAGTCACATCAG
PPP1R15A	GGGAAGTCAATTTGCAGATGG	CGGTGTGATGGTGGATAAGAG
SASH1	TGAAGACGAGGAGAAACCCA	GGTCGCTGTTACTGTCTACTC
SCL2A3	GGATGAGCTTGTCTGTATTGG	CTAAATAGTGAGCAGCGGAGG
SERPINB2	GAGGAGAGGAGATTGAAACAATGG	GGGAGAGGAAGAGGTTCTGG
TIPARP	CCACAATTCATTCTCAGGAGAG	CCACCAAGTGCTGTAAATATGGA

**Tabla 5.** Lista de los iniciadores específicos de genes usados para RT-qPCR.

## i) Aprobación ética y consentimiento de participación

No aplicable, dado que el estudio no involucró ni a pacientes, ni a voluntarios, ni a animales.

## Disponibilidad de los datos

Los datos en bruto y procesados de la secuenciación de ARN se encuentran disponibles en la base de datos pública de GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), bajo el número de ingreso GSE144215.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Shahram Shahabi de Standard Homeopathic Company por suministrar el extracto etanólico de *D. rotundifolia* y por la valiosa conversación sobre el manuscrito. El presente trabajo ha recibido el apoyo de una donación de Standard Homeopathic Company, Los Ángeles (Estados Unidos) a la Universidad de Verona, Departamento de Medicina. El financiador ha contribuido con los costos de los materiales, el equipo y dos becas post-doctorales. El financiador no ha participado en absoluto en los experimentos, ni en el análisis de los resultados ni en la publicación de los datos. Los autores agradecen al Centro Piattaforme

Tecnologiche dell'Università degli Studi di Verona por su contribución técnica a los experimentos de Espectrometría de Masa y secuenciación de ARN.

## Contribuciones de los autores

F.A.S. y M.M. realizaron los experimentos, analizaron los resultados y redactaron el manuscrito. P.B. supervisó el programa de investigación, los resultados y la redacción del manuscrito. Todos los autores revisaron el manuscrito.

## Intereses en conflicto

Los autores declaran no tener intereses en conflicto.

## Información adicional

La correspondencia y solicitudes de materiales deben dirigirse a F.A.S.

La información sobre reimpresiones y autorizaciones se encuentra disponible en [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

## REFERENCIAS

1. Sevar R. Audit of outcome in 455 consecutive patients treated with homeopathic medicines. *Homeopathy*. Oct 2005; 94 (4): 215–221. doi: 10.1016/j.homp.2005.07.002
2. Haidvogel M, Riley DS, Heger M, Brien S, Jong M, Fischer M, Lewith GT, Jansen G, Thurneysen AE. Homeopathic and conventional treatment for acute respiratory and ear complaints: A comparative study on outcome in the primary care setting. *BMC Complement. Altern. Med.* 2 Mar 2007; 7, 7. doi: 10.1186/1472-6882-7-7
3. Saha SK, Roy S, Khuda-Bukhsh AR. Ultra-highly diluted plant extracts of *Hydrastis canadensis* and *Marsdenia condurango* induce epigenetic modifications and alter gene expression profiles in HeLa cells in vitro. *J. Integr. Med.* Nov 2015; 13(6): 400–411. doi: 10.1016/S2095-4964(15)60201-1
4. Danno K, Cognet-Dementhon B, Thevenard G, Duru G, Allaert FA, Bordet MF. Management of the early symptoms of influenza-like illnesses and ear, nose and throat (ENT) disorders by pharmacists. *Homeopathy*. Oct 2014; 103(4): 239–249. doi: 10.1016/j.homp.2014.04.001
5. Homeopathic medicine for acute cough in upper respiratory tract infections and acute bronchitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 27, Feb 2014; 27(1): 102–108. doi: 10.1016/j.pupt.2013.05.007
6. Jacobs J, Taylor JA. A randomized controlled trial of a homeopathic syrup in the treatment of cold symptoms in young children. *Complement. Ther. Med.* Dec 2016; 29: 229–234. doi: 10.1016/j.ctim.2016.10.013

7. Frass M, Linkesch M, Banyai S, Resch G, Dielacher C, Löbl T, Endler C, Haidvog M Muchitsch I, Schuster E. Adjunctive homeopathic treatment in patients with severe sepsis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in an intensive care unit. *Homeopathy*. Abr 2005; 94(2): 75-80. doi: 10.1016/j.homp.2005.01.002
8. Boericke W. *Pocket Manual of Homeopathic Materia Medica & Repertory*. 1997.
9. Allaert FA, Villet S, Vincent S, Sauve L. Observational study on the dispensing of cough syrups to children with acute cough by community pharmacists in France. *Minerva Pediatr*. Abr 2018; 70(2): 117-126. doi: 10.23736/S0026-4946.17.04752-1
10. Voß, HW, Michalsen A, Brünjes R. Efficacy and tolerability of a complex homeopathic drug in children suffering from dry cough-A double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Drug Res. (Stuttg.)*. 2018; 68(08): 444-449. doi: 10.1055/s-0043-124179
11. Zanasi A, Cazzato S, Mazzolini M, Ierna CMS, Mastroroberto M, Nardi E, Morselli-Labate Am. Does additional antimicrobial treatment have a better effect on URTI cough resolution than homeopathic symptomatic therapy alone? A real-life preliminary observational study in a pediatric population. *Multidiscip. Respir. Med*. 2015; 10(1): 25. doi: 10.1186/s40248-015-0022-3
12. Bordes L, Dorfman P. Evaluation de l'activité antitussive du siropDrosetux: Etude en double aveugle versus placebo. *Les Cah. d'otorhinolaringol*. 1986; 21(9): 731-734.
13. Zehl M, Braunberger C, Conrad J, Crnogorac M, Krasteva S, Vogler B, Beifuss U, Krenn L. Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in therapeutically important *Drosera* species by LC-DAD, LC-NMR, NMR, and LC-MS. *Anal Bioanal Chem*. 5 Feb 2011; 400: 2565–2576. doi: 10.1007/s00216-011-4690-3
14. Paper DH, Karall E, Kremser M, Krenn L. Comparison of the antiinflammatory effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM assay. *Phyther. Res*. 2005; 19: 323-326. doi: 10.1002/ptr.1666
15. Mattioli V, Zanolin ME, Cazzoletti L, Bono R, Cerveri I, Ferrari M, Pirina P, Garcia-Larsen V. Dietary flavonoids and respiratory diseases: A population-based multi-case-control study in Italian adults. *Public Health Nutr*. 30 Ene 2020; 23(14), 2548-2556. doi: 10.1017/S1368980019003562
16. Krenn L, Beyer G, Pertz HH, Karall E, Kremser M, Galambosi B, Melzig MF. In vitro antispasmodic and anti-inflammatory effects of *Drosera rotundifolia*. *Arzneimittelforschung*. 2004; 54(7): 402-405. doi: 10.1055/s-0031-1296991
17. Carsin A, Mazenq J, Ilstad A, Dubus JC, Chanez P, Gras D. Bronchial epithelium in children: A key player in asthma. *Eur. Respir. Rev*. 2016; 25: 158-169. doi: 10.1183/16000617.0101-2015
18. Heijink IH, Brandenburg SM, Postma DS, van Oosterhout AJM. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur. Respir. J*. 2012; 39: 419-428. doi: 10.1183/09031936.00193810
19. Awatade NT, Wong SL, Hewson CK, Laura K, Fawcett LK, Kicic A, Jaffe A, Waters SA. Human primary epithelial cell models: Promising tools in the era of cystic fibrosis personalized medicine. *Front. Pharmacol*. 7 Dic 2018; 9: 1429. doi: 10.3389/fphar.2018.01429
20. Blume C, Davies DE. In vitro and ex vivo models of human asthma. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2 Jun 2013; 84(2): 394-400. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.12.014
21. Mayer AK, Bartz H, Fey F, Schmidt LM, Dalpke AH. Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment. *Eur. J. Immunol*. 20 May 2008; 38(6), 1689-1699. doi: 10.1002/eji.200737936
22. Riechelmann H, Deutschle T, Grabow A, Heinzow B, Butte W, Reiter R. Differential response of mono mac 6, BEAS-2B, and jurkat cells to indoor dust. *Environ. Health Perspect*. 1 Sep 2007; 115 (9): 1325-1332. doi: 10.1289/ehp.9874
23. Fisher P. What is homeopathy? An introduction. *Front. Biosci*. 1 Ene 2012; (Elite Ed.) 4: 1669-1682. doi: 10.2741/489
24. Bellavite P, Signorini A, Marzotto M, Moratti E, Bonafini C, Olioso D. Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. *Homeopathy*. Abr 2015; 104 (2): 139-160. doi: 10.1016/j.homp.2015.02.002
25. Marotti I, Betti L, Bregola V, Bosi S, Trebbi G, Borghini G, Nani D, Dinelli G. Transcriptome profiling of wheat seedlings following treatment with ultrahigh diluted arsenic trioxide. *Evid.-based Complement. Altern. Med*. 27 Nov 2014; 2014: 851263. doi: 10.1155/2014/851263
26. Marzotto M, Olioso D, Brizzi M, Tononi P, Cristofolletti M, Bellavite P. Extreme sensitivity of gene expression in human SH-SY5Y neurocytes to ultra-low doses of *Gelsemium sempervirens*. *BMC Complement. Altern. Med*. 19 Mar 2014; 14: 104.
27. Bigagli E, Luceri C, Dei A, Bernardini S, Dolara P. Effects of extreme dilutions of *Apis mellifica* preparations on gene expression profiles of human cells. *Dose-Response*. Ene 2016; 14: 1-7. doi: 10.1177/1559325815626685
28. Lagunin AA, Ivanov SM, Glorizova TA, Pogodin PV, Filimonov DA, Kumar S, Goel RK. Combined network pharmacology and virtual reverse pharmacology approaches for identification of potential targets to treat vascular dementia. *Sci. Rep*. 2020; 10: 257. doi: 10.1038/s41598-019-57199-9
29. Fukushima K, Nagai K, Hoshi Y, Masumoto S, Mikami I, Takahashi Y, Oike H, Kobori M. *Drosera rotundifolia* and *Drosera tokaiensis* suppress the activation of HMC-1 human mast cells. *J. Ethnopharmacol*. 17 Ago 2009; 125(1): 90-96. doi: 10.1016/j.jep.2009.06.009

30. Paper DH, Karall E, Kremser M, Krenn L. Comparison of the antiinflammatory effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM assay. *Phytother. Res.* 2005; 19, 323-326. doi: 10.1002/ptr.1666
31. Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil. Med. Res.* 19 May 2015; 2: 12. doi: 10.1186/s40779-015-0039-0
32. Marin ND, Dunlap MD, Kaushal D, Khader SA. Friend or foe: The protective and pathological roles of inducible bronchus-associated lymphoid tissue in pulmonary diseases. *J. Immunol.* 1 May 2019; 202(9): 2519-2526. doi: 10.4049/jimmunol.1801135
33. Bellavite P, Ortolani R, Pontarollo F, Pitari G, Conforti A. Immunology and homeopathy. 5. The rationale of the ' Simile'. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 5 Feb 2007; 4(2): 149-163. doi: 10.1093/ecam/nel117
34. Bell IR. The complexity of the homeopathic healing response part 1: The role of the body as a complex adaptive system in simillimum-initiated recovery from disease. *Homeopathy.* 2020; 109(02): 24-50. doi: 10.1055/s-0039-1694998
35. Bell IR. The complexity of the homeopathic healing response part 2: The role of the homeopathic simillimum as a complex system in initiating recovery from disease. *Homeopathy.* May 2020; 109(2): 51-64. doi: 10.1055/s-0039-1694999
36. Peiseler M, Kubes P. More friend than foe: The emerging role of neutrophils in tissue repair. *J. Clin. Investig.* 17 Jun 2019; 129(7): 2629-2639. doi: 10.1172/JCI124616
37. Tang Y, Scheef EA, Wang S, Sorenson CM, Marcus CB, Jefcoate CR, Sheibani N. CYP1B1 expression promotes the proangiogenic phenotype of endothelium through decreased intracellular oxidative stress and thrombospondin-2 expression. *Blood.* 2009. 113(3): 744-754. doi: 10.1182/blood-2008-03-145219
38. Palenski TL, Gurel Z, Sorenson CM, Hankenson KD, Sheibani N. Cyp1B1 expression promotes angiogenesis by suppressing NF- $\kappa$ B activity. *Am. J. Physiol. Physiol.* 1 Dic 2013; 305: C1170–C1184. doi:10.1152/ajpcell.00139.2013
39. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 1 Ene 1965; 16: 144: 158.
40. Gottardo R, Sorio D, Musile G, Trapani E, Seri C, Serpelloni G, Tagliaro F. Screening for synthetic cannabinoids in hair by using LC-QTOF MS: A new and powerful approach to study the penetration of these new psychoactive substances in the population. *Med. Sci. Law. Ene* 2013; 54 (1): 22-27. doi: 10.1177/0025802413477396
41. Lechner JF, Laveck MA. A serum-free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J. Tissue Cult. Methods.* Jun 1985; 9: 43-48. doi: 10.1007/BF01797773.
42. Arruda-Silva F, Bianchetto-Aguilera F, Gasperini S, Polletti S, Cosentino E, Tamassia N, Cassatella MA. Human neutrophils produce CCL23 in response to various TLR-agonists and TNF $\alpha$ . *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12 May 2017; 7: 176. doi: 10.3389/fcimb.2017.00176
43. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods.* 2017; 14: 417-419. doi: 10.1038/nmeth.4197
44. Sonesson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences [version 2; peer review: 2 approved]. *F1000Research.* 29 Feb 2016; 4: 1521. doi: 12688/f1000research.7563.2
45. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 5 Dic 2014; 15: 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
46. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, Vilo J g:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* 8 May 2019; 47(W1): W191-W198. doi: 10.1093/nar/gkz369
47. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003; 13: 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303