

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Facultad de Ciencias y Filosofía

“Alberto Cazorla Talleri”



“Evaluación de poblaciones linfocitarias en el microambiente tumoral de ratones con melanoma tratados con *Uncaria tomentosa*.”

Tesis para optar por el título de licenciado en Biología

Kahn Serrudo, Laura María

Lima - Perú

2016

**ASESOR:**

Iván Lozada-Requena, MSc.

## JURADO:

Manuela Verástegui Pimentel, PhD. (Presidente)

Teresa Barreto Gaviria, MSc. (Secretaria)

Dora Maurtua Torres, MSc. (Vocal)

## DEDICATORIA

Les dedico este trabajo a mis papás. Gracias por estar conmigo apoyándome en todo momento. Soy la persona que soy por ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Laboratorio de Inmunología. Muchas gracias al Dr. Aguilar e Iván por darme la oportunidad de realizar este y muchos otros trabajos en el laboratorio. Gracias por todo lo que me han enseñado, por el tiempo que me dedicaron a mí y a este proyecto.

Además, gracias a todos los integrantes del laboratorio. Gracias por el tiempo que me brindaron y por los momentos compartidos.

Por último, quiero agradecer a todas esas personas que me han acompañado a lo largo de este viaje, apoyándome, dándome fuerzas y aconsejándome.

# INDICE

ABSTRACT .....	i
RESUMEN.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Melanoma .....	2
1.2 Modelo de melanoma en ratones C57BL/6.....	3
1.3 <i>Uncaria tomentosa</i> .....	4
1.4 Poblaciones linfocitarias.....	5
1.4.1 Linfocitos T helper .....	6
1.4.2 Linfocitos T citóxicos.....	6
1.4.3 Linfocitos T reguladores (Treg) .....	6
1.4.4 Marcadores.....	7
2. HIPÓTESIS .....	9
3. OBJETIVOS .....	9
3.1 Objetivos generales.....	9
3.2 Objetivos específicos .....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
4.1 Extracto de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	10
4.2 Cultivo de línea celular B16 e inducción del tumor .....	10
4.3 Cálculo del tamaño de muestra.....	11
4.4 Animales de laboratorio.....	12
4.5 Extracción y homogenización del tumor B16.....	13
4.6 Aislamiento de células mononucleares del microambiente tumoral.....	14
4.8 Análisis estadístico.....	16
5. RESULTADOS.....	18
5.1 Linfocitos totales en el microambiente tumoral.....	18
5.2 Poblaciones de LTh, LTc y Treg en el microambiente tumoral.....	19
5.3 Nivel de activación de las subpoblaciones de linfocitos T en el microambiente tumoral .....	23
5.4 Relación LTc/Tregs .....	27
5.5 Volumen tumoral y metástasis .....	29
6. DISCUSIÓN.....	31
7. CONCLUSIONES.....	35
8. RECOMENDACIONES.....	36

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
ANEXOS .....	44
ANEXO 1. Preparación de PBS .....	44
ANEXO 2. Cantidad de células B16 para la inoculación de los ratones.....	45
ANEXO 3. Medición del tumor con Vernier.....	46
ANEXO 4. Tumor extraído, triturado y procesado con colagenasa. ....	47
ANEXO 5. Células de MT obtenidas mediante gradiente de densidad con Histopaque. ....	48
ANEXO 6. Titulación de anticuerpos monoclonales .....	49
ANEXO 7. Preparación de Cell Fix.....	52
ANEXO 8. Obtención de linfocitos totales a través de Forward y Side Scatter. ....	53

## ABSTRACT

T cells such as CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and T regulators (Treg), among others, play a major role in cancer immunity. An increase in Tregs is taken as a negative prognosis, as they can interfere with the host's defense. Studies have assessed the CD8<sup>+</sup>/Treg ratio in the tumor microenvironment and suggest that a high value correlates with a better outcome in cancer patients. *In-vitro* and *in-vivo* studies have shown *Uncaria tomentosa's* antitumoral properties. **Objective:** Evaluate UT's modulating effect over sub-populations of T cells in the tumour microenvironment of mice with melanoma. **Methods:** Female C57BL/6 mice were inoculated with cancer cell line B16 (10<sup>5</sup>cells) to induce a melanoma solid tumour. We worked with three treatment groups (100, 500, 1000 mg/kg) and two control groups (positive and treatment). Mice were fed with a double UT extract (UT-POA) by gavage 7 days prior to tumour inoculation and 8 more days after. When the tumours reached 4.5 mm, they were harvested and homogenized. Mononuclear cells of the tumor microenvironment (CMMT) were obtained with Ficoll Histopaque gradient centrifugation. The CMMT were marked with specific monoclonal antibodies for CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Tregs and also an activation marker (CD69). The acquisition and analysis were made with a FACSCanto II cytometer, BDBiosciences. **Results:** The total lymphocytes populations showed an increase in the three treatment groups. Moreover, there was no presence of tumour metastasis in the treatment groups in contrast with the control groups that did show cases of metastases. **Conclusions:** The results in our study show in first place, that the antitumoral effect of UT-POA is not due to the increase in cytotoxic T lymphocytes nor the decrease of Tregs. Nevertheless, they suggest that UT-POA at 100, 500 and 1000 mg/kg raise the populations of B cells in the tumor microenvironment. Moreover, the mice treated with the UT extract didn't show cases of metastases whilst the mice in the control groups did.



## RESUMEN

En la respuesta antitumoral participan linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y reguladores (Treg), entre otros. El incremento de Tregs durante un cáncer es indicativo de un pronóstico negativo, ya que pueden inhibir la respuesta antitumoral del huésped. Investigaciones han evaluado el ratio LT CD8<sup>+</sup>/Treg en el microambiente tumoral y sugieren que un valor alto se correlaciona con una mejor prognosis en pacientes con cáncer. Estudios *in-vivo* e *in-vitro* han demostrado propiedades anti-tumorales de *Uncaria tomentosa* (UT). **Objetivo:** Evaluar el efecto modulador de un doble extracto de UT sobre subpoblaciones de LT en el microambiente tumoral (MT) de ratones con melanoma. **Métodos:** Se utilizaron 10 ratones C57BL/6 hembras por grupo, a quienes se les indujo un tumor sólido con la línea celular B16 (10<sup>5</sup> cél). Se trabajó con 3 grupos de tratamiento (100, 500, 1000 mg/kg) y 2 controles (positivo y de tratamiento). Los ratones fueron alimentados vía sonda gástrica con UT-POA 7 días antes de la inoculación de la línea celular y 8 días después. Se sacrificaron cuando el tumor alcanzaba 4.5 mm de volumen. Se obtuvieron células mononucleares del microambiente tumoral (CMMT) mediante homogenización y luego gradiente de densidad con Histopaque. Las CMMT fueron marcadas con anticuerpos específicos para LT CD4<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup>, Tregs y un marcador de activación (CD69). La adquisición y análisis fue hecha en un citómetro de flujo FACSCanto II, BDBiosciences. **Resultados:** Las poblaciones de linfocitos totales en el MT incrementaron significativamente en los tres grupos de tratamiento. Además no hubo metástasis en los ratones tratados con UT-POA, mientras que en los controles sí hubo casos de metástasis. **Conclusión:** Los resultados del presente estudio demuestran en primer lugar que el efecto anticancerígeno de UT-POA no ocurre mediante el incremento de linfocitos CD8<sup>+</sup> (LTc) ni la disminución de Tregs. Sin embargo, sugieren que UT-POA a 100, 500 y 1000 mg/kg aumentan las poblaciones de linfocitos B (LB) en el MT. Además los grupos de tratamiento con UT-POA no presentaron casos de metástasis a diferencia de los controles.

## ABREVIATURAS

**CF:** Ciclofosfamida o Control de tratamiento

**CMMT:** Células mononucleares del microambiente tumoral

**CP:** Control positivo

**FSC:** Dispersión de luz frontal en citometría de flujo.

**LB:** Linfocitos B

**LT:** Linfocitos T

**LTc:** LT citotóxicos o LT CD8<sup>+</sup>

**LTh:** LT helper o ayudadores o LT CD4<sup>+</sup>

**MT:** Microambiente tumoral

**NK:** Células Natural Killer

**NKT:** Células T Natural Killer

**SI:** Sistema Inmune

**SSC:** Dispersión de luz lateral en citometría de flujo

**TA:** Temperatura Ambiente

**TCR:** Receptor de las células T

**Treg:** Linfocitos T reguladores

**UT:** *Uncaria tomentosa*

**UT-POA:** Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* estandarizado al 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos y diluido en agua destilada (30g/L) obteniéndose un extracto acuoso, al que llamaremos **doblo extracto**.

**xg:** gravedades

## 1. INTRODUCCIÓN

A inicios del siglo XX, Paul Ehrlich fue uno de los primeros en notar la importancia del sistema inmune (SI) y sus efectos protectores contra el cáncer. A lo largo del siglo XX se realizaron experimentos donde se logró un mejor entendimiento del SI y el descubrimiento de antígenos tumorales<sup>(1,2)</sup>. Burnet y Thomas postularon la teoría de la inmunovigilancia en cáncer, la cual sigue vigente<sup>(3,4)</sup>. En esa época no pudo confirmarse dicha teoría, sin embargo en la actualidad no solo se ha probado que el SI está constantemente vigilando la posible aparición de un cáncer, sino que además esculpe la inmunogenicidad de las células tumorales. Por lo mismo, se sugiere un doble rol del sistema inmune frente al cáncer, uno donde protege al hospedero y otro donde establece condiciones favorables para la propagación del tumor<sup>(5)</sup>.

El cáncer es una enfermedad multifactorial y hoy en día es abordado por distintos enfoques terapéuticos. En los últimos años se han realizado avances importantes en el campo de la inmunoterapia, la que definitivamente representará en el futuro una herramienta eficaz para combatir de manera específica a los tumores. No obstante, la inmunoterapia y en general la medicina convencional son de poco acceso a la mayoría de la población debido a los elevados costos para su consumo a largo plazo. Ante esta situación es necesario ensayar otras estrategias que aborden el problema tratando de reducir los costos de manera significativa. En la Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023, se menciona que para millones de personas alrededor del mundo la medicina tradicional y alternativa es aún la principal fuente de atención sanitaria y en muchos casos la única. Esto debido a precios más asequibles y mayor accesibilidad. Por otro lado, son medicinas que se han usado a lo largo de la historia en muchas culturas por lo que se les tiene mayor confianza<sup>(6)</sup>. Sin embargo, su uso debe estar reglamentado y sobretodo sus propiedades deben estar científicamente comprobadas para que no queden como meras comunicaciones o hechos empíricos transmitidos de generación en generación.

En numerosos países alrededor del mundo se evalúa y se realiza la integración de la medicina tradicional o alternativa con la medicina convencional. Abdullahi

explica como en África antes de la introducción de la medicina “cosmopolita”, la medicina tradicional era el sistema médico dominante para la mayor proporción de la población. Dado que la medicina tradicional abarca en muchos casos la cultura de diferentes pueblos, se quieren tomar medidas para incorporarla al sistema médico actual<sup>(7)</sup>. Además, mientras que las terapias convencionales suelen traer consigo múltiples efectos secundarios, la ventaja de los productos naturales es que sus efectos secundarios son mínimos, ya que su toxicidad es baja<sup>(8)</sup>.

No obstante, toda nueva estrategia debe pasar necesariamente por modelos *in vitro* y modelos animales que permitan tener un mejor entendimiento de los mecanismos de acción y posibles implicancias previo a ser evaluada en humanos. En esa misma línea este estudio pretende obtener más información sobre la respuesta inmune antitumoral en un modelo de melanoma inducido en ratones de laboratorio.

## 1.1 Melanoma

El melanoma es el cáncer de piel más letal. Sus principales características son su gran capacidad para hacer metástasis y su quimioresistencia<sup>(9)</sup> lo que lo hace altamente agresivo. El melanoma se origina a partir de los melanocitos, que son células ubicadas en la epidermis, en los ojos, oído interno, meninges, huesos y corazón. Los melanocitos producen la melanina, pigmento que da el color a la piel. El melanoma es más común en personas con el color de piel más claro<sup>(10)</sup>. El melanoma primario posee dos fases de desarrollo: a) el crecimiento radial o crecimiento horizontal, es la proliferación dentro de la misma epidermis y b) el crecimiento vertical, la invasión a capas más profundas de la dermis u otros tejidos <sup>(11)</sup>.

En un inicio, para un establecimiento exitoso, el melanoma debe realizar acciones, donde no solo las células cancerígenas interactúen con las células del SI o con la matriz extra celular, sino además debe liberar factores de crecimiento o citoquinas. La liberación de factores angiogénicos y factores de crecimiento de fibroblasto es crucial en estadios tempranos para asegurar su proliferación y el abastecimiento de nutrientes y oxígeno<sup>(12)</sup>. Asimismo, el MT es mayormente inmunosupresivo. Las células cancerosas liberan factores que

alteran las funciones de las células del SI, disminuyendo su actividad y favoreciendo a la propagación del tumor. Entre estos factores está la liberación de TGF $\beta$  y IL-10, ambas citoquinas son liberadas por células tumorales o células del sistema inmune<sup>(13)</sup>.

Por lo tanto, siendo el melanoma un grave problema que afecta a gran parte de la población expuesta a la radiación solar, un factor de riesgo que se viene incrementando con el cambio climático a nivel global, existen diversos grupos de investigación que estudian este tipo de cáncer y utilizan un modelo animal que reproduce con gran similitud las características del tumor sólido en el humano<sup>(14)</sup>. Incluso a partir de los estudios con este modelo, se han podido obtener anticuerpos monoclonales para el tratamiento en humanos como el anti-CTLA-4 (Ipilimumab) y anti-PD-1 (Pembrolizumab), los que ya fueron aprobados por la FDA de los Estados Unidos<sup>(15-19)</sup>.

## 1.2 Modelo de melanoma en ratones C57BL/6

Los estudios realizados en cultivos celulares e *in vitro* impulsaron diversas áreas de la investigación en ciencias de la salud. Sin embargo, la complejidad de los procesos biológicos requiere de estudios *in vivo*. Por lo tanto, estas investigaciones deben realizarse en modelos que asemejen las aberraciones genéticas y epigenéticas, histología, efectos fisiológicos y el patrón metastásico<sup>(20)</sup> que ocurren en un cáncer en humanos. El desarrollo de estos modelos tiene diferentes objetivos como son: a) la identificación de nuevos genes asociados al cáncer y marcadores; b) conocer a fondo los mecanismos moleculares y celulares que ocurren en la iniciación del tumor; c) comprender los procesos de la tumorigénesis con sus múltiples estadios y d) la evaluación crítica de nuevos tratamientos<sup>(21)</sup>. Los ratones como modelo animal poseen ciertas ventajas las cuales son: a) su tamaño pequeño; b) bajo costo de mantenimiento; c) la rapidez de su reproducción y la cantidad de individuos por camada y d) pueden ser manipulados genéticamente<sup>(22)</sup>.

Existen diversos procedimientos para desarrollar modelos animales. Los métodos más comunes son el xenotransplante, el transplante singénico y por último, la modificación genética, donde principalmente se activan oncogenes y/o inactivan genes supresores de tumores<sup>(23,24)</sup>. Dentro del modelo de

transplante singénico se encuentra el modelo de melanoma B16 en la cepa C57BL/6<sup>(20)</sup>.

Los modelos de melanoma más comunes utilizan ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6, siendo esta última una de las líneas más usadas para la investigación. El uso de esta cepa de ratones tiene diversas ventajas. Es la cepa de ratones más utilizada, por lo que se hace referencia a ellos en más del 90% de las publicaciones<sup>(25)</sup>. Fue la primera cepa en tener su genoma secuenciado y es genéticamente estable, por lo que es más probable obtener resultados reproducibles<sup>(26)</sup>. Estos ratones son susceptibles a la línea celular cancerígena B16 de melanocitos, los cuales al cabo de 8 a 15 días inducen un tumor sólido, superficial y notablemente visible por la producción de melanina, en el lugar de inoculación y estimulan la angiogénesis activa que conlleva a principalmente a una metástasis pulmonar<sup>(27)</sup>. Por todos estos motivos decidimos usar este modelo para evaluar las características internas del MT.

### 1.3 *Uncaria tomentosa*

*Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.; es una planta nativa de la Amazonía peruana<sup>(28)</sup>. La corteza de la raíz de UT, es utilizada a manera de una decocción y ha sido consumida durante años por tribus indígenas del Perú<sup>(28-31)</sup>. Entre los usos propuestos están el tratamiento de inflamaciones como la artritis, enfermedades virales, estomacales, cáncer y otras<sup>(32)</sup>. A raíz de estos antecedentes se han realizado estudios para investigar el origen de las propiedades de UT y conocer los mecanismos por los cuales actúa. Se han reportado más de 50 componentes constituyentes de la corteza de la raíz de UT, incluyendo alcaloides oxindólicos (mitrafilina, isomitrafilina, speciofilina, uncarina F), triterpenos, glicósidos de ácido quinóico, entre otros<sup>(32,33)</sup>. En muchos casos, el efecto anti-inflamatorio, anti-proliferativo, anti-oxidante y anti-neoplásico de UT se ha atribuido a los alcaloides oxindólicos<sup>(28,34,35)</sup>. No obstante, también se ha sugerido que su acción sea consecuencia de un sinergismo entre todos sus componentes<sup>(36,37)</sup>. Se ha propuesto que su mecanismo de acción es a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B además de inhibir la liberación de TNF- $\alpha$ <sup>(38)</sup>. Otros estudios indican que la acción anti-

proliferativa de un extracto acuoso de UT no es específica a células tumorales, sino que también afecta células normales<sup>(39)</sup>.

Los estudios que han evaluado el efecto de la UT a nivel de poblaciones linfocitarias dentro del MT son escasos o casi inexistentes. Urdanibia *et al.* evaluaron infiltrados celulares en un tumor de mama en ratones mediante inmunohistoquímica. Ellos observaron que un tratamiento con *Uncaria guianensis* disminuyó los infiltrados de LT CD4<sup>+</sup> y LB<sup>(40)</sup>. *Uncaria guianensis*, otra especie de *Uncaria*, con la cual también se han observado efectos, sin embargo no es endémica de Perú ni se han realizado tantos estudios sobre ella como en el caso de UT. Lozada-Requena *et al.* evaluaron el efecto de UT-POA en poblaciones linfocitarias en sangre periférica y los resultados indicaron que UT-POA tiene un efecto dosis dependiente sobre los LTh. Con la dosis de 50 mg/kg los LTh disminuyeron y a la mayor concentración (1000 mg/kg) incrementaron significativamente<sup>(41)</sup>. Sin embargo, en varios estudios se ha identificado que la respuesta inmune de los linfocitos es diferente a nivel de MT y sangre periférica. Holmes comparó la proliferación, capacidad intrínseca citotóxica y el fenotipo de LT y LB en el tumor y en sangre periférica de humanos y encontró que mientras los porcentajes de linfocitos son parecidos en ambos lugares, la actividad de las células en el tumor está inhibida<sup>(42)</sup>.

#### 1.4 Poblaciones linfocitarias

Se ha demostrado la presencia de elementos del SI dentro del MT y es probable que dichos elementos mantengan una batalla contra el tumor y contra los factores tumorales liberados por este<sup>(43,44)</sup>. Esto último se correlaciona con la capacidad de evasión inmune que tienen tumores como el melanoma<sup>(45)</sup>.

Se ha evaluado la invasión de linfocitos al tumor como parámetro de pronóstico<sup>(46)</sup>. Se han observado células tumorales necróticas asociadas a linfocitos infiltrados lo que sugiere una acción de las células inmunocompetentes sobre las células cancerígenas<sup>(47)</sup>, por lo que es lógico pensar que a mayor infiltración de linfocitos el paciente tendrá un mejor pronóstico. Sin embargo, hay diferentes poblaciones de linfocitos que actúan de manera distinta en el MT.

#### 1.4.1 Linfocitos T helper

Los LTh son un subconjunto de LT  $\alpha\beta$ . Son LT  $\alpha\beta$  porque poseen el heteródmero  $\alpha\beta$  en el TCR. Tienen un papel importante en el control y regulación del SI mediante la ayuda a otros LT, LB y respuestas del SI innato. Los LTh suelen expresar el co-receptor CD4. Este co-receptor reconoce el MHC de clase II.

Los LTh son necesarios para la óptima inducción y la expansión clonal de los LTc. Además los LTh condicionan a las células dendríticas de manera que puedan estimular a los LTc. Por último, para la respuesta de los LTc es crítica la liberación de IL-2 de parte de los LTh<sup>(48,49)</sup>.

#### 1.4.2 Linfocitos T citóxicos

Asimismo, la presencia de linfocitos CD8<sup>+</sup>, también conocidos como linfocitos citotóxicos, dentro del MT es indicador de una mejor respuesta antitumoral<sup>(44,50)</sup>. Esta subpoblación de LT tiene como función principal el reconocimiento y eliminación de células infectadas por virus o algún otro microorganismo intracelular. Los LTc reconocen el MHC de clase I de células presentadoras de antígenos. Los LTc también reconocen antígenos tumorales y son en parte encargados de la eliminación de células cancerígenas por medio de la liberación de su gránulos citotóxicos que llevan a la célula infectada a la apoptosis. Por tal motivo, Sato *et al.* en dos estudios demuestran que un valor mayor al tercil inferior (4.8) en la relación de LTc/Treg es señal de una mejor prognosis en pacientes con carcinoma urotelial y cáncer de ovario<sup>(51,52)</sup>. En ratones el anticuerpo monoclonal específico es el CD8a<sup>+</sup>.

#### 1.4.3 Linfocitos T reguladores (Treg)

Los Treg son linfocitos con inmunofenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Los Treg son linfocitos que se pueden generar a nivel de timo (Treg naturales) o en la periferia (Treg inducibles)<sup>(53)</sup>. El rol de los Treg dentro del SI es la regulación de diversos mecanismos, los que luego de ser activados deben volver a su nivel de homeostasis. Es probable que por este motivo, los tumores actúan sobre los



Treg y así evitan que el SI reaccione. Por lo tanto, los estudios demuestran que los factores tumorales actúan sobre los Treg para incrementar su presencia y así disminuir la respuesta inmune en beneficio de la progresión del tumor<sup>(18,54,55)</sup>.

Los Treg se observaron en primer lugar en la defensa del huésped contra enfermedades autoinmunes. Se observaron células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, a las que en un inicio se les denominó células supresoras. En un experimento realizado por Sakaguchi *et al*, eliminaron las células CD25<sup>+</sup> en una suspensión celular mediante anticuerpos monoclonales específicos y luego fue inoculada en ratones atímicos inmunodeficientes (“nude mice”) los cuales posteriormente desarrollaron enfermedades autoinmunes. Cuando se restauró la población de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se previnieron enfermedades, tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o gastritis autoinmune con anemia perniciosa<sup>(56)</sup>. Más adelante se observó que los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> también se presentaban dentro del microambiente tumoral e inhibían la respuesta anti-tumoral. Tradicionalmente, cuando aún no se conocía la existencia del marcador FoxP3, los LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fueron identificados como una población que suprime activamente las respuestas inmunes, inhibiendo la activación de células T autoreactivas.

Uno de los intereses en este estudio fue evaluar el nivel de los Treg en el MT de ratones tratados con UT-POA en vista que creemos que el MT podría ser estimulado a favor del huésped y en contra de los factores de evasión por parte del tumor. Además, no hay trabajos previos donde se evalúe la relación entre UT y los Tregs. Por otro lado, tomaremos la cuantificación de los LTc y el cálculo de la relación entre estos y los Treg como un indicador para evaluar un posible efecto positivo de UT como tratamiento.

#### 1.4.4 Marcadores

El grupo de diferenciación CD25 consiste en la cadena alfa del receptor de la citoquina IL-2. EL receptor de IL-2 consiste en 3 cadenas, y la expresión de la cadena IL-2 $\alpha$  ocurre debido a la presencia del ligando IL-2.

CD4, por otro lado, es un correceptor del TCR (T cell receptor) que se une al MHC II y facilita la señalización de TCR durante la activación de las células T.

Sin embargo, el CD4 no es exclusivo de células T, sino que a su vez está presente en las células dendríticas y macrófagos. El CD3 es un marcador específico de células T y el que usualmente se usa para su identificación. No obstante en el presente trabajo se ha optado por la identificación de los linfocitos mediante el “gating”, tomando en cuenta su tamaño y granularidad en el análisis de los datos de citometría.

El marcador CD8, se encuentra predominantemente en la superficie de los LTc. Está compuesto por dos cadenas (alfa y beta), la cadena alfa interactúa con la molécula del MHC de clase I de las células blanco, y es la afinidad entre ellos la que los mantiene fuertemente unidos durante la activación. Finalmente, el marcador CD69 diferencia a las células T activadas, ya que aparece tempranamente tras su activación y está involucrado en la proliferación de linfocitos y la transmisión de señales<sup>(57)</sup>.

## 2. HIPÓTESIS

El doble extracto de *Uncaria tomentosa* incrementa el porcentaje de las poblaciones de linfocitos totales, linfocitos T helper (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), linfocitos T citotóxicos (CD8a<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), su activación (CD69<sup>+</sup>) y además la relación LTc/Tregs y disminuye los porcentajes de LT reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), su activación (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), el volumen tumoral y la metástasis en ratones con melanoma.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivos generales

- Evaluar si el tratamiento con un doble extracto de *Uncaria tomentosa* (UT-POA) incrementa o disminuye las poblaciones celulares de LT (LTh, LTc y LTreg) y la relación LTc/Treg en el MT de ratones con melanoma

### 3.2 Objetivos específicos

- Inducir un tumor sólido de melanoma en un modelo animal de ratones C57BL/6
- Evaluar el efecto de UT-POA en los porcentajes de poblaciones de linfocitos totales, LTh CD4<sup>+</sup>, LTc CD8a<sup>+</sup> y Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, su grado de activación (CD69<sup>+</sup>) y la relación LTc/Treg dentro del MT
- Determinar el efecto de UT-POA sobre el volumen tumoral y la metástasis

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo es un estudio exploratorio de ciencia básica que se realizó en el Laboratorio de Inmunología #108, Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

### 4.1 Extracto de *Uncaria tomentosa*

Se utilizó un extracto hidroalcohólico obtenido a partir de la corteza de la raíz de UT, en forma de un polvo de color marrón. El extracto fue proporcionado por Peruvian Heritage® preparado por decocción usando etanol y agua en proporción de 70:30 por 1h a 20°C y subsecuente secado por atomización. Esta preparación contiene 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos, cuantificados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) según Dreifuss *et al*<sup>(37)</sup>.

A partir de este producto se preparó una solución stock de UT-POA pesando 30 g del polvo, se agregó a un matraz de 5L y se diluyó en un 1L de agua bi-distilada, dejando hervir la mezcla por 30 minutos para luego dejar reposar (segunda extracción). Una vez enfriada la mezcla se decantó, se filtró dos veces en papel Whatman N°3 y finalmente se microfiltró en cabina de flujo laminar con un filtro de 0,22 µm. Se prepararon alícuotas de 5 mg/mL y se guardaron a -20°C siendo estas la solución stock.

### 4.2 Cultivo de línea celular B16 e inducción del tumor

La línea celular B16, donada por el Dr. Claudio Acuña (Universidad Santiago de Chile), fue descongelada días antes de la inoculación y cultivada en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI completo (RPMI-1640, suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL) y piruvato de sodio al 0.01%.

Para la inducción del tumor se comprobó que la confluencia de células en el frasco de cultivo fuera del 70%. Se lavó el frasco de cultivo con PBS estéril (**Ver Anexo 1**) y luego se agregaron 3 mL de Tripsina –EDTA 0.25% y se

incubó por 8 minutos a 37°C. Luego se retiraron las células y se hicieron dos lavados con medio RPMI incompleto (RPMI-1640, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 ug/mL). Las células se contaron en una cámara de Neubauer con una dilución 1:10 en azul de Tripán y se resuspendieron en PBS pH 7.2. La concentración de células inoculadas fue de 10<sup>5</sup> células en 100 µL de PBS por ratón (**Ver Anexo 2 Tabla A**). Estas se inocularon en el flanco izquierdo de la región abdominal del animal. Para que esta técnica de resultado es de gran importancia que la inoculación sea subcutánea, por lo que hay que observar la formación de una pápula al momento de la inyectar las células.

### 4.3 Cálculo del tamaño de muestra

Se tomó como referente el trabajo de Langroudi *et al.* En su trabajo evaluaron el efecto del fármaco ciclofosfamida (CF) sobre Tregs en el MT de ratones hembras Balb/c con tumores de mama. La CF es un fármaco usado en el tratamiento de cáncer y de enfermedades autoinmunes<sup>(58)</sup> y además se ha reportado un efecto inhibitor de la CF sobre los Tregs<sup>(59)</sup>. Langroudi *et al.* trabajaron con 5 ratones por grupo. Reportaron estos datos:

	Valor	SD
CP	28.39	11.9
CF	23.51	2.75761

Con estos datos se aplicó la fórmula<sup>(60,61)</sup>:

$$n = \frac{2SD^2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{d^2}$$

SD= Desviación estándar

d= CP – CF (valor de efecto esperado)

Z<sub>β</sub>= 0.842 (Tabla Z) poder de 80%

Z<sub>α/2</sub>=1.96 (Tabla Z) Error tipo 1 de 5%

$$n = \frac{24.43}{2} = \mathbf{12.22}$$

El n es de 12 individuos por grupo, sin embargo se trabajó con 10 ratones por grupo ya que se disponía de esta cantidad de animales en el bioterio de UPCH.

#### 4.4 Animales de laboratorio

Se usaron ratones hembras de la cepa C57BL/6 de 6 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. La ejecución del proyecto fue aprobada por el Comité de Ética para el Uso de Animales CIEA de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con el código de inscripción 62867. Los animales fueron divididos en 5 grupos experimentales:

- CP: inoculación de B16 sin tratamiento. Se les administró agua destilada diariamente por sonda gástrica
- CF: inoculación de células B16 y tratamiento con CF. La CF es un fármaco antitumoral y se administró una sola dosis intraperitoneal de 150mg/kg (aprox 3 mg por ratón) el día siguiente a la inoculación de las células B16<sup>(54)</sup>
- 100 mg/kg: Tratamiento con UT-POA 100 mg del extracto por kg de peso
- 500 mg/kg: Tratamiento con UT-POA 500 mg del extracto por kg de peso
- 1000 mg/kg: Tratamiento con UT-POA 1000 mg del extracto por kg de peso

Se distribuyeron 10 ratones en cada grupo, con un total de 50 ratones.

Tal como se describe en la **Figura 1**, el tratamiento con UT-POA se inició 7 días antes de la inoculación de las células B16 y continuó por 8 días. El periodo del tratamiento se determinó arbitrariamente. En experimentos donde evalúan el efecto de UT suelen empezar su administración el mismo día de la inoculación del tumor. No obstante, en estos protocolos los ratones tenían un

tiempo de vida más largo (14 días o más), lo cual permitía que la UT esté en una mayor concentración dentro del organismo y pudiera lograr un efecto. En este protocolo, los ratones no vivirían más de 8 días después de la inoculación del tumor, por lo que se decidió iniciar el tratamiento 7 días antes. La extracción de los tumores se realizó en una etapa temprana de crecimiento ya que Beyer *et al.* mencionan que en un estadio temprano hay menor presencia de Treg y es más adelante que estos proliferan<sup>(54)</sup>. En un estadio posterior, la presencia de Tregs hubiera sido dominante y no hubiera permitido evaluar el efecto de UT-POA sobre otras poblaciones de linfocitos.

Los ratones fueron alimentados con sonda gástrica diariamente a las 10:00 am. Las dosis se administraron de acuerdo a su peso corporal. El día 7 se inocularon  $10^5$  células B16 por ratón para que inicie el desarrollo del tumor. El tumor inicialmente se desarrolla en el lugar de inoculación (flanco izquierdo de la cavidad abdominal), sin embargo puede hacer metástasis.

Se realizaron mediciones diarias del tamaño del tumor con un Vernier (**Ver foto en Anexo 3**). El tumor que se tomaba como referencia para las mediciones diarias fue siempre el que se encontraba en el lugar de la inoculación ya que en algunos casos aparecieron otros tumores o hacían metástasis. Cuando los tumores llegaban a medir 4.5 mm se procedía a sacrificar al ratón para extraer el tumor, y una vez extraído, se efectuaba una última medición. La segunda medición era esencial ya que el valor del tamaño del tumor, antes y después de ser extraído, podía variar. Para el cálculo del volumen tumoral se utilizó la fórmula:  $\frac{w^2 \times l}{2}$ , donde "w" es el ancho y "l" el largo<sup>(62)</sup>.

#### 4.5 Extracción y homogenización del tumor B16

Se usó material de disección autoclavado y enjuagado con etanol al 70% para la extracción y homogenización del tumor. Para la extracción se hizo un corte longitudinal en el abdomen del ratón para exponer la zona del tumor y proceder a extraerlo. Luego de ser removido, el tumor se colocó en un tubo de fondo cónico de 15 mL con 2 mL de solución salina a 4°C para conservar el tejido hasta el momento de la homogenización.

Para la homogenización se cortó el tumor en fracciones pequeñas (< 3 mm) en una placa Petri estéril. Los trozos de tumor se colocaron en los bordes ásperos de láminas de microscopio para ejercer presión con ellas y aumentar la liberación de células. Se agregó 1 mL de colagenasa tipo I Gibco® (0.5% w/v) al disgregado de células con los tejidos restantes. Se incubó por 30 minutos a 37°C. Cada 10 minutos durante la incubación se agitó la solución en un vórtex para conseguir una mayor disgregación del tejido (**Ver foto en Anexo 4**). Después se pasó la suspensión por un filtro que consistió en gasas estériles puestas sobre tubos de fondo cónico de 15 mL. Con una pipeta de transferencia se recuperó la suspensión filtrada y se pasó por el filtro de gasa. Se realizó un lavado de la placa con medio RPMI incompleto para evitar la pérdida de células<sup>(63)</sup>.

#### 4.6 Aislamiento de células mononucleares del microambiente tumoral

La suspensión obtenida en el paso 4.5 (8 mL aprox) fue agregada a un tubo de fondo cónico de 15 mL que contenía 4 mL de Ficoll-Histopaque  $\rho = 1,083$  g/mL (Sigma, St Louis, MO, USA) a temperatura ambiente (TA).

Luego se centrifugó a 1800 rpm (450 x g) por 30 minutos, sin freno. Se recuperó el anillo celular formado en la parte intermedia (capa de células mononucleares) y se pasó a un nuevo tubo (**Ver foto en Anexo 5**). Luego se hicieron dos lavados agregando 13 mL de medio RPMI incompleto, el primero a TA y el segundo a 4°C, ambos por 10 minutos a 2500 rpm (750 x g). Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de medio RPMI completo. Se contaron las células en una cámara de Neubauer haciendo una dilución 1 en 10 con azul de Tripán. Se obtuvieron un aproximado de  $2 \times 10^5$  células mononucleares por tumor. Estas se dejaron incubando en 100  $\mu$ L de RPMI completo en tubos estériles de citometría por 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 98% de humedad.



## 4.7 Citometría de flujo

Después de 24 horas de incubación, se centrifugaron las muestras a TA y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ L de buffer de tinción. Se procedió con la marcación con anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorocromos previamente titulados (**Ver Anexo 6, Fig A, Tabla B**) anti-CD4-PE (1/800), anti-CD8a-APC (1/400), anti CD69-PerCP (1/800) y anti-CD25-FITC (1/100) y se dejó incubando por 30 minutos a 4°C en oscuridad. A continuación se realizaron dos lavados adicionando 1 mL de buffer de lavado a los tubos y centrifugándolos por 5 minutos a 2500 rpm (750 x g). Finalmente, se resuspendieron las células marcadas en 400  $\mu$ L cell fix (**Ver Anexo 7**) para su posterior lectura.

Previamente, en una etapa de estandarización, se realizó la compensación de anticuerpos con un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Immunocytometry Systems, USA). La adquisición se realizó con el software BD FACSDiva v6.1.3. El análisis de datos se ejecutó con el software FlowJo vX0.7.

El análisis de los resultados de la citometría de flujo se realizó a partir de la selección de la población de Linfocitos Totales, clasificados de acuerdo a sus propiedades físicas de tamaño (Forward Scatter, FSC) y granularidad (Side Scatter, SSC). A partir de la identificación de estas poblaciones, se determinaron los porcentajes de las sub poblaciones de LTh, LTC y Treg utilizando gráficas de contorno y los respectivos marcadores que las identifican como tales (**Ver Anexo 8, Fig B**).

#### 4.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron representados con gráficos de caja y bigotes, donde se representa la mediana. El análisis estadístico fue realizado con el software GraphPad Prism versión 6. Las comparaciones entre grupos fueron realizadas por la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. Un valor de probabilidad menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ) fue considerado estadísticamente significativo.

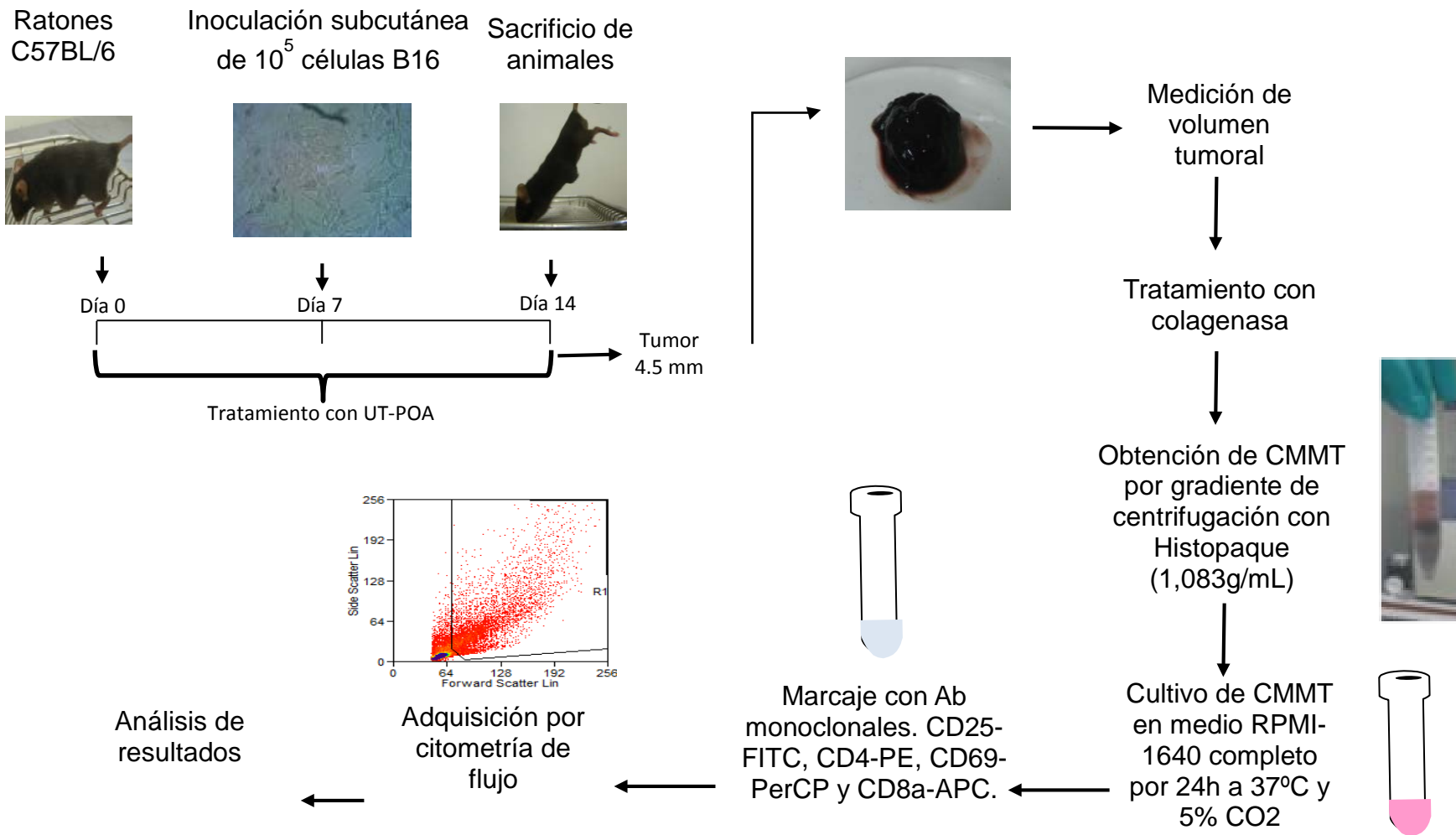
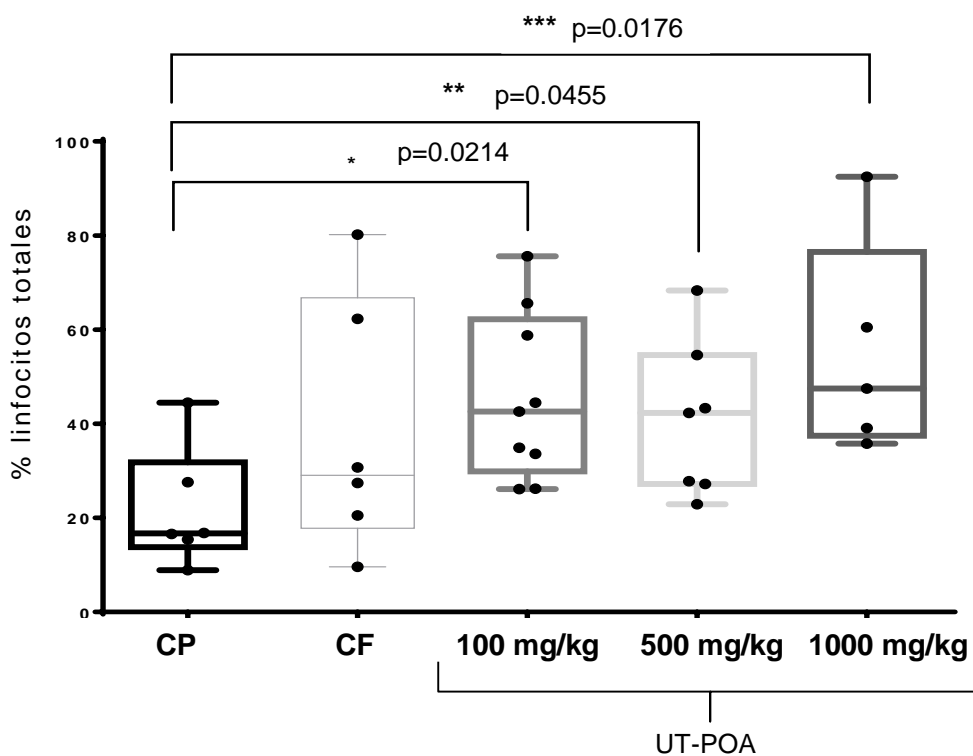


Figura 1. Diseño experimental

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Linfocitos totales en el microambiente tumoral

Se encontró que UT-POA a nivel de MT, incrementó las poblaciones de linfocitos totales. La presencia de linfocitos totales aumentó significativamente en los tres grupos de tratamiento con 100, 500 y 1000 mg/kg de UT-POA, mientras que en el grupo CF incrementa, pero no significativamente ( $p>0.05$ ) (Fig. 2).

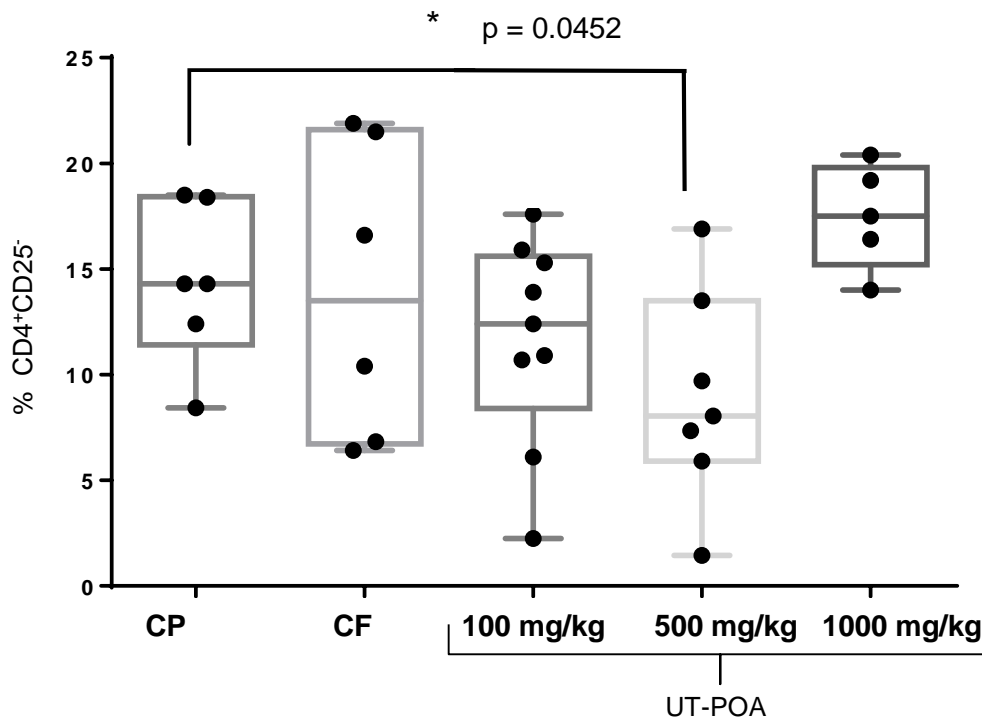


**Figura 2. Porcentaje de linfocitos totales en el MT y efecto de diferentes dosis de UT-POA.** Los Linfocitos Totales fueron determinados a partir de los parámetros de FSC vs SSC durante la citometría de flujo de CMMT para cada control o dosis de tratamiento con UT-POA. El porcentaje de linfocitos totales se incrementó de manera dosis dependiente. Se consideró diferencia estadísticamente significativa (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney) si  $p<0.05$  comparado con el CP. MT= Microambiente tumoral; UT-POA= 100, 500 y 1000 mg/kg; FSC/SSC= Dispersión frontal y lateral de la luz durante la citometría de flujo; CMMT=Células Mononucleares de Microambiente tumoral; CP=Control Positivo; CF=Control de tratamiento.

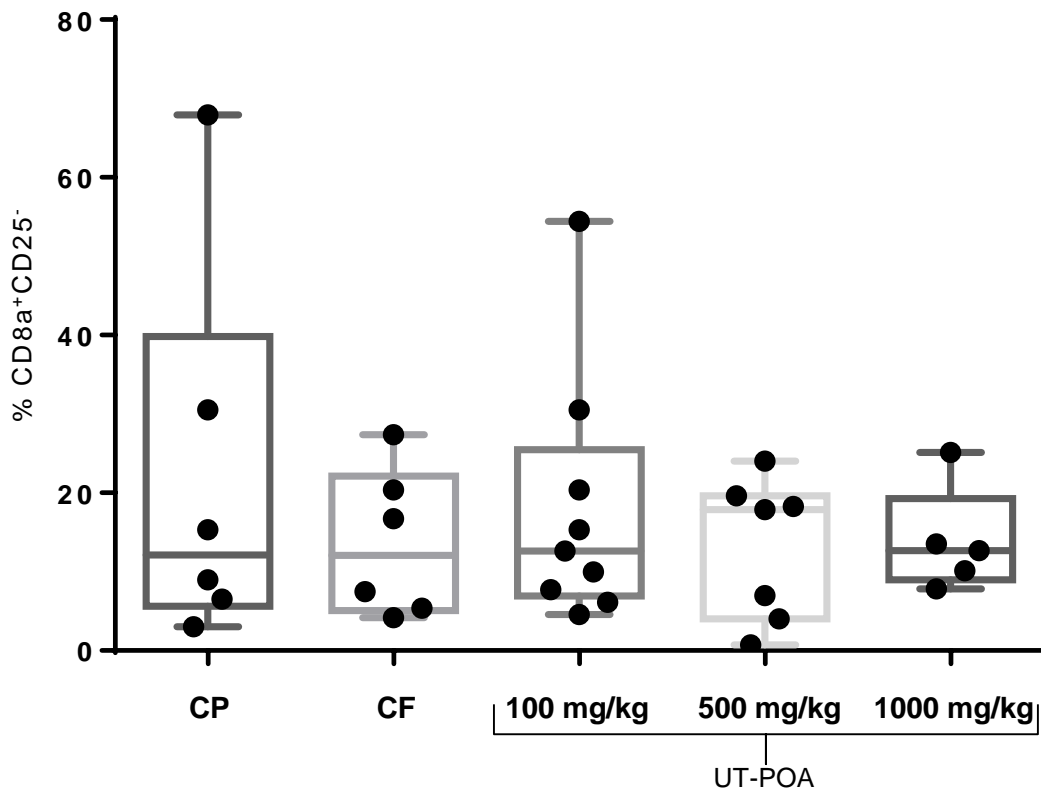
## 5.2 Poblaciones de LTh, LTc y Treg en el microambiente tumoral

Para la determinación de las poblaciones, los LTh fueron considerados como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, los LTc como CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> y los Treg como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. En el caso de los Treg no fue posible usar el marcador FoxP3 por la falta de disponibilidad; sin embargo, los análisis de Treg humanos realizados en el Laboratorio de Inmunología utilizando FoxP3 demuestran que este marcador se encuentra presente en los CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y no en los CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, lo que sugiere que la probabilidad que los CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> definidos en este estudio como Treg es bastante alta. Además, en ratones, la probabilidad de que los LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sean FoxP3<sup>+</sup> es muy alta, ya que su inducción no se da con la activación del CD25<sup>(64)</sup>. No obstante, se recomienda que en estudios similares se incluya el marcador FoxP3.

En relación al efecto de UT-POA sobre los LTh en el MT, se encontró que la dosis 500 mg/kg disminuyó ligeramente el porcentaje de LTh ( $p=0.0452$ ); mientras que UT-POA a 100 y 1000 mg/kg no modifican los porcentajes de LTh **(Fig. 3)**.

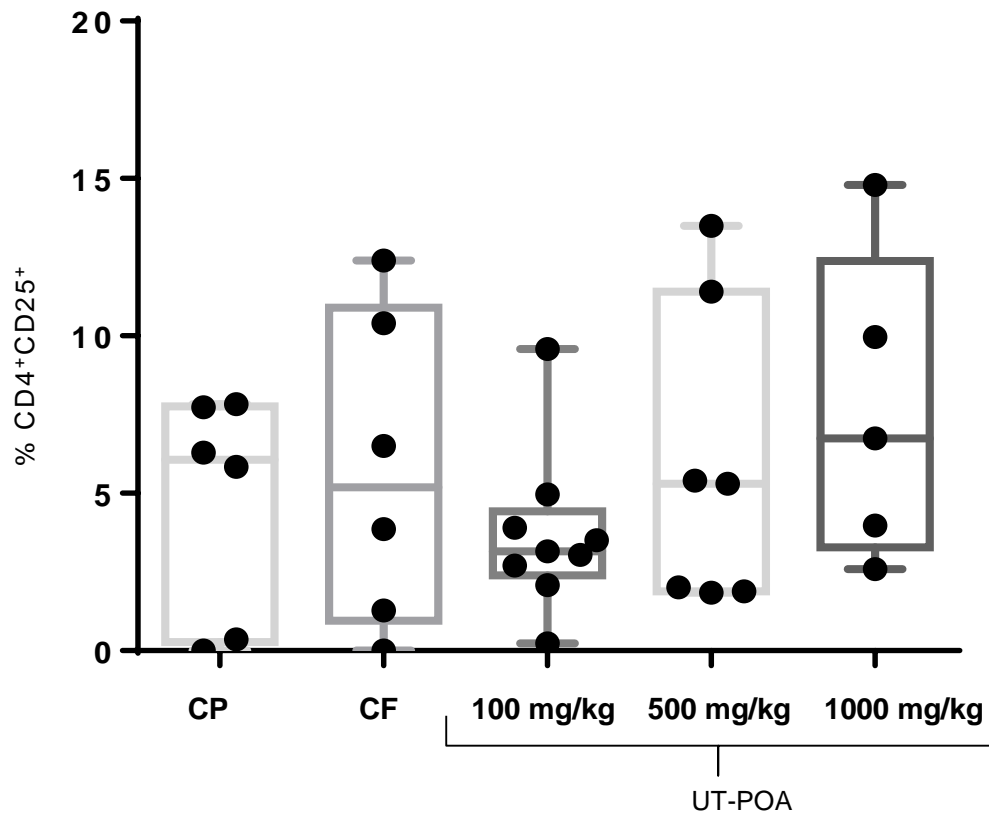


**Figura 3. Porcentaje de LTh en el MT de ratones con melanoma tratados con UT-POA.** Las poblaciones de LTh fueron seleccionadas a partir de la expresión de marcador CD4 y ausencia del marcador CD25 dentro de los Linfocitos Totales. El grupo de tratamiento 500 mg/kg presentó una disminución comparado con el CP ( $p=0.0452$ ). Se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. Si  $p<0.05$  se consideró significancia estadística. LTh=Linfocitos T helper; MT=microambiente tumoral; UT-POA=doble extracto de UT; CP=Control Positivo; CF=Control de Tratamiento.



**Figura 4. Porcentaje de LTc en el MT de ratones con melanoma tratados con UT-POA.** Los LTc fueron seleccionados a partir de las poblaciones de Linfocitos Totales. Las células CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> fueron consideradas como LTc. Los porcentajes de LTc no presentaron cambios estadísticamente significativos. Se consideró significancia estadística si  $p < 0.05$  (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitey). LTc=Linfocitos T citotóxicos; MT=microambiente tumoral; UT-POA=doble extracto de UT; CP=Control Positivo; CF=Control de Tratamiento.

Cuando se analizaron los efectos de UT-POA sobre los porcentajes poblacionales de LTc y Treg en el MT de ratones con melanoma se observó que ambas poblaciones no fueron modificadas significativamente por el extracto (Fig. 4 y 5).



**Figura 5. Porcentaje de Tregs en el MT de ratones tratados con UT-POA.** Los Tregs fueron seleccionados a partir de las poblaciones de Linfocitos Totales. Se determinaron a partir de la expresión de los marcadores CD4 y CD25. Los Treg no presentaron diferencias significativas respecto a los controles. Se utilizó la prueba estadística de Wilcoxon-Mann-Whitney y se consideró significancia estadística si  $p < 0.05$  comparado con el CP. Tregs= Células T reguladoras; MT= Microambiente Tumoral; UT-POA=100, 500 y 1000 mg/kg; CP= Control Positivo; CF= Control de tratamiento.

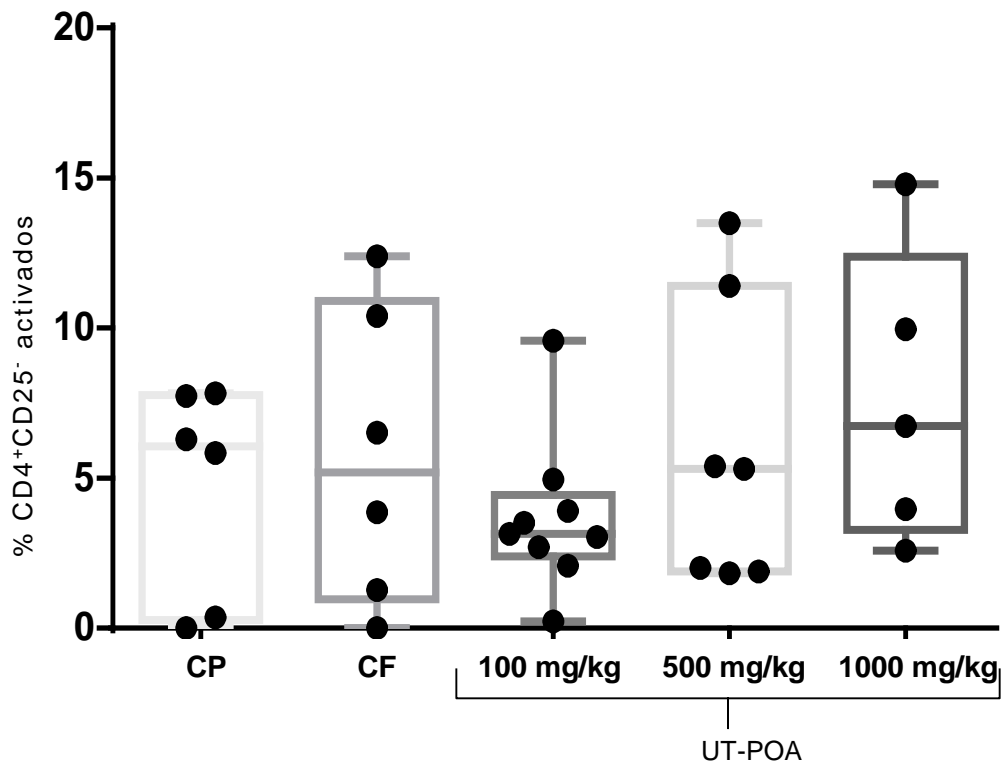


### 5.3 Nivel de activación de las subpoblaciones de linfocitos T en el microambiente tumoral

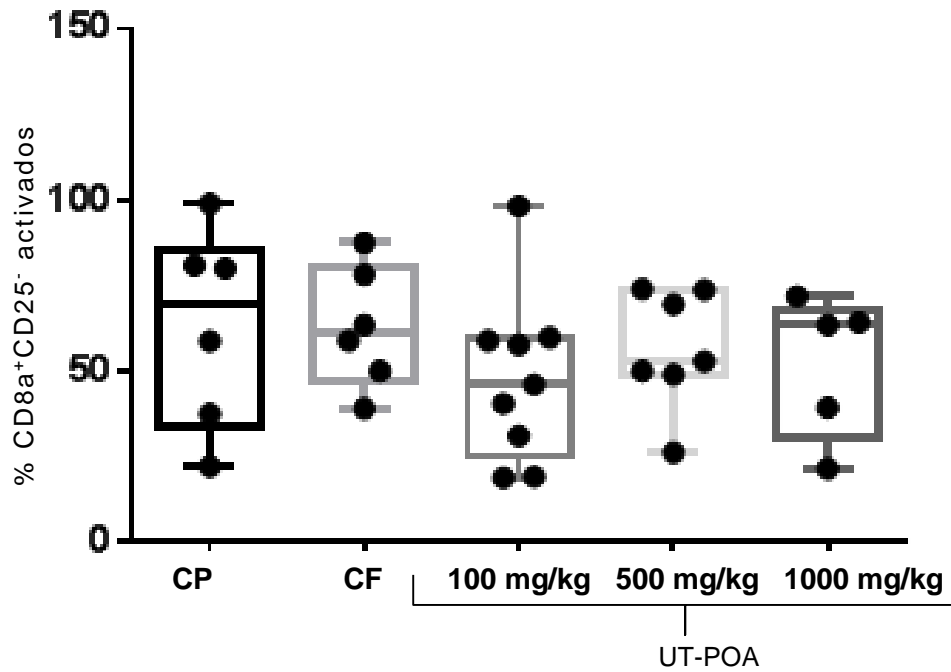
Es sabido por varios estudios que el marcador CD69 es un indicador del nivel de activación celular<sup>(57,65)</sup> de células como linfocitos, por tanto se quiso averiguar si además de modificar los porcentajes de poblaciones linfocitarias, la UT-POA podía modificar el nivel de activación de estas células, es decir, si UT-POA podía cambiar su status de linfocitos vírgenes o naïve a linfocitos activados con capacidad de montar una respuesta inmune.

Para este objetivo se incluyó junto con los anticuerpos para inmunofenotipicar a los LTh, LTc, y Treg, el anticuerpo anti-CD69, con lo cual luego de identificar estas poblaciones se pudo además analizar su nivel de activación.

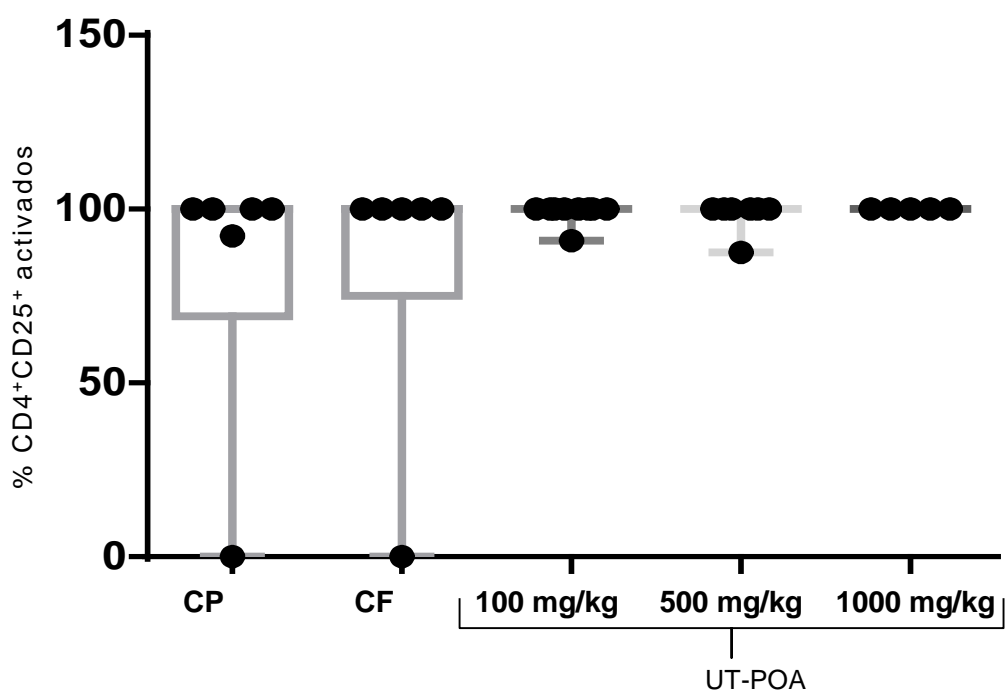
Luego de la evaluación estadística de estas tres subpoblaciones linfocitarias, no se encontraron diferencias significativas del efecto de UT-POA sobre el nivel de activación **(Fig. 6, 7 y 8)**.



**Figura 6. Evaluación de la activación de los LTh usando el marcador CD69 en el MT de ratones tratados con UT-POA.** Se determinó el porcentaje de activación de los LTh mediante la expresión del marcador de activación CD69 en las poblaciones de LTh previamente seleccionadas. No se encontró significancia estadística entre los grupos de tratamiento (prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney). Se interpretó un  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. LTh= Linfocitos T helper; MT=Microambiente Tumoral; UT-POA= doble extracto de UT; CP=Control Positivo; CF=Control de Tratamiento.



**Figura 7. Efecto de UT-POA sobre la activación de LTc en ratones con melanoma.** Se determinó la activación de LTc mediante la expresión del marcador de activación CD69 en las poblaciones de LTc previamente seleccionadas. No hubo diferencias estadísticas en cuanto a la activación de LTc en ninguno de los grupos evaluados. Se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. Si  $p < 0.05$  se consideró significancia estadística. UT-POA= doble extracto de UT; LTc= Linfocitos Citotóxicos; CP= Control positivo; CF= Control de Tratamiento.



**Figura 8. Activación de Tregs en el MT de ratones tratados con UT-POA.** Se determinó la activación en las subpoblaciones de Tregs previamente identificadas mediante el uso de marcador de activación CD69. La activación en los Tregs en los grupos evaluados no presentó diferencias respecto a los controles ( $p > 0.05$ ). Se realizó la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. Tregs=Linfocitos T reguladores; MT=Microambiente Tumoral; UT-POA=doble extracción de UT; CP=Control Positivo; CF=Control de Tratamiento.

## 5.4 Relación LTc/Tregs

Se ha observado que el porcentaje de infiltración de linfocitos en el MT es un parámetro adecuado para evaluar el pronóstico de un paciente con cáncer. Como se ha mencionado antes, hay linfocitos que actúan en pro del tumor como es el caso de los LTc, y otros que tienen respuestas anti tumorales, por ejemplo los Treg<sup>(18)</sup>.

La relación LTc/Treg nos da un panorama del porcentaje de infiltración de cada una de estas subpoblaciones. Lógicamente, si este valor es mayor a 1, es debido a la presencia predominante de LTc. Sin embargo, es cuando  $LTc/Treg > 4.8$  donde se observa una diferencia en cuanto a la supervivencia de los pacientes<sup>(52)</sup>. Por otro lado, si la relación es menor a 1, se debe a que la presencia de Treg es influyente.

Cada “datapoint” en la **Figura 9** corresponde al ratio LTc/Treg de cada uno de los grupos (CP, CF, 100 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg). Se consideró estadísticamente significativo si  $p < 0.05$ . No hubo diferencias estadísticas entre los grupos.

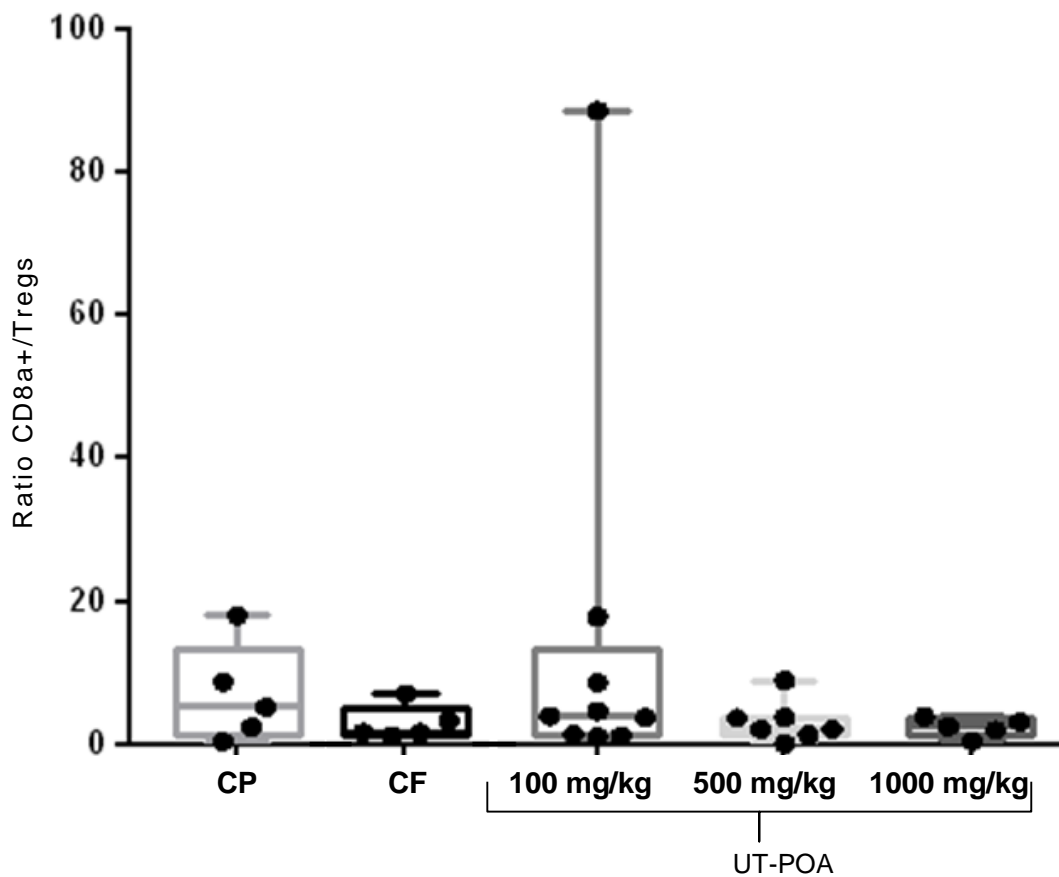
Como se observa en la **Tabla 1**, ninguno de los grupos mostró un valor superior a 4.8. Además, en la **Figura 9**, observamos que no hay significancia estadística entre los grupos.

**Tabla 1. Mediana de la relación LTc/Treg de los controles y grupos de tratamiento.**

<b>Grupos</b>	<b>LTc/Treg</b>
<b>CP</b>	4.69
<b>CF</b>	2.61
<b>100 mg/kg</b>	3.91
<b>500 mg/kg</b>	2.13
<b>1000 mg/kg</b>	2.52

CP=Control Positivo; CF=Control de tratamiento.

100, 500 y 1000 mg/kg = grupos de tratamiento.



**Figura 9. Relación entre las subpoblaciones de LTc y Treg (LTc/Treg) de ratones con melanoma tratados con UT-POA.** Se determinó la relación LTc/Tregs utilizando el ratio de cada dato correspondiente de ambos grupos (LTc y Tregs). No se encontró ninguna diferencia estadística entre los diferentes grupos y el CP ( $p > 0.05$ ) (Prueba de Wilcoxon-Mann-Whitey). LTc=Linfocitos T citotóxicos; Tregs=Linfocitos T reguladores; UT-POA=doble extracto de UT; CP=Control Positivo; CF=Control de tratamiento.

## 5.5 Volumen tumoral y metástasis

Las mediciones de los volúmenes tumorales mostraron que UT-POA no presenta un efecto estadísticamente significativo sobre el volumen tumoral (**Fig. 10**).

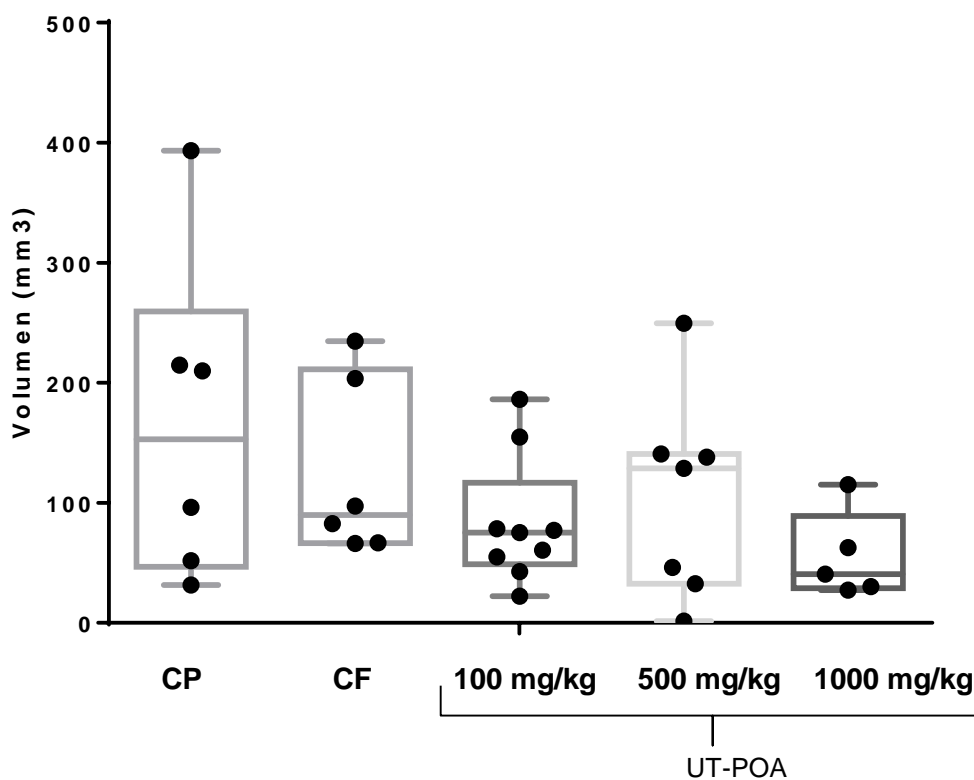
En cuanto a la metástasis, como se presenta en la **Tabla2**, en el CP hubo 04 casos de metástasis y en el CF hubo 02 casos de metástasis. Los grupos de tratamiento (100, 500 y 1000 mg/kg) no presentaron casos de metástasis.

**Tabla 2. Volumen promedio de los tumores extraídos de los ratones y casos con metástasis.**

<b>Grupos</b>	<b>Volumen promedio</b>	<b>Metástasis</b>	<b># de casos de metástasis (n= 10)</b>
<b>CP</b>	153.04	Sí	4
<b>CF</b>	89.99	Sí	2
<b>100 mg/kg</b>	77.73	No	0
<b>500 mg/kg</b>	133.4	No	0
<b>1000 mg/kg</b>	40.53	No	0

CP=Control Positivo; CF=Control de Tratamiento.

100, 500 y 1000 mg/kg = Grupos de Tratamiento.



**Figura 10. Efecto de UT-POA sobre el volumen tumoral de ratones con melanoma.** Volúmenes obtenidos a partir de la medición del largo y ancho de los tumores luego de haber sido extraídos. No se encontraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) en los volúmenes de los tumores respecto al CP. Se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. UT-POA=doble extracto de UT; CP=Control Positivo; CF=Control de Tratamiento.



## 6. DISCUSIÓN

El melanoma es un cáncer de piel altamente agresivo. El riesgo de desarrollarlo aumenta significativamente con los niveles crecientes de radiación UV debido al adelgazamiento de la capa de ozono<sup>(10)</sup>. En la actualidad, existen tratamientos que intentan paliar la progresión del melanoma, en lo que destacan las inmunoterapias biológicas; sin embargo, debido a su complicada distribución y altos costos, no son accesibles a la mayor parte de la población. Por tal motivo, evaluar otras alternativas como los productos naturales y en particular la UT es perfectamente válido.

En las investigaciones en melanoma existe un modelo animal que es aceptado por la comunidad científica, ya que reproduce en gran medida las condiciones de esta neoplasia en el humano<sup>(25)</sup>; por tanto el presente estudio utiliza el mismo modelo animal de melanoma en ratones C57BL/6 inducido con la línea celular B16.

En relación a UT, gran parte de los estudios científicamente comprobados han demostrado su capacidad anti-inflamatoria<sup>(34,66)</sup> y muy pocos su capacidad antitumoral in vivo. Algunos como Dreifuss *et al.* demostraron en el modelo de carcinosarcoma inducido con células Walker-256, que un extracto hidroalcohólico de UT disminuía el tamaño y volumen tumoral. Por otro lado, un estudio preliminar de nuestro grupo evaluó otras poblaciones inmunocompetentes del MT como células NK, células dendríticas y perfil de citoquinas Th1/Th2/Th17, donde se observó que UT-POA incrementa la relación CD4/CD8a a nivel sistémico pero no en el MT<sup>(41)</sup>.

En cuanto a la capacidad anti-inflamatoria de UT, se ha demostrado en diversos estudios que este efecto es mayor en extractos hidro-alcohólicos<sup>(34)</sup>. Es importante mencionar que la actividad anticancerígena de UT podría atribuirse a la acción inhibitoria de este extracto sobre la inflamación, ya que se ha demostrado que el cáncer es en muchos casos un resultado de la inflamación crónica. Sin embargo, otros estudios demuestran que la acción anticancerígena de UT es resultado de la inhibición del ciclo celular y además mencionan que tiene el mismo efecto sobre células normales y células tumorales<sup>(39)</sup>. En el presente estudio, los resultados sugieren que UT-POA tiene

un efecto estimulante sobre los linfocitos totales, incrementando su porcentaje en el MT.

El presente estudio evaluó el efecto de UT-POA sobre las poblaciones linfocitarias totales, LTh, LTc y Treg en el MT de ratones con melanoma. Los resultados indican que a las tres dosis evaluadas de UT-POA existe un incremento significativo dosis-dependiente de los linfocitos totales (LT, LB y NK) en el MT (**Fig. 2**); sin embargo, como se discutirá más adelante, las poblaciones de LT no fueron afectadas. Asimismo, en el estudio de Lozada-Requena *et al.* se demostró que en el MT del mismo modelo, UT-POA no modificó las poblaciones de NK y NKT<sup>(41)</sup>. Por lo tanto, es posible que el incremento pueda deberse a la población de LB los cuales no han sido medidos en estos estudios y deberían ser evaluados.

Cuando evaluamos las poblaciones de LTh (**Fig. 3**) se observó una disminución significativa de LTh a 500 mg/kg, no obstante, cuando se evalúa el valor  $p=0.0452$ , se observa que es un valor alto y que por lo tanto esa disminución no sería lo suficientemente sólida a pesar de la significancia estadística.

En el caso de LTc y Treg la UT-POA no modificó significativamente estas poblaciones (**Fig. 4 y 5**). Esto se correlaciona con lo encontrado por Lozada-Requena *et al.* quienes tampoco observaron cambios en las poblaciones LTh CD4<sup>+</sup>, LTc CD8a<sup>+</sup> en el MT. En el estudio de Lozada-Requena *et al.* se encontró un incremento significativo de la relación CD4<sup>+</sup>/CD8a<sup>+</sup> a nivel sistémico y no en el MT<sup>(41)</sup>. Al particular se debe tener en cuenta la biodisponibilidad del extracto de UT en el modelo animal teniendo en cuenta que los animales son alimentados con el extracto y que este debe pasar por el sistema digestivo antes de llegar al MT. Esto afectaría la biodisponibilidad de los compuestos químicos del extracto que son capaces de inducir algún efecto biológico. A esto se suma que el extracto de UT utilizado en este estudio es en realidad resultado de una doble extracción (1° hidroalcohólica, 2° acuosa), lo que también contribuiría a la disminución de su potencia. Por tanto, se recomienda la evaluación del extracto hidroalcohólico sin la segunda extracción. En este caso, la forma en polvo del extracto hidroalcohólico deberá disolverse en Dimetilsulfóxido (DMSO) o Tween para luego completar la disolución en agua<sup>(36,67)</sup>.

Por lo anteriormente discutido podemos sugerir que son los LB los afectados por UT-POA, como lo demuestra Domingues *et al.* quienes midieron el efecto de un extracto hidroalcohólico de UT en esplenocitos de ratones sanos. Los resultados reportaron que el extracto favorecía el perfil de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-5) siendo estas citoquinas clave para la activación de LB y su transformación a plasmocitos<sup>(68)</sup>. Además, a la mayor concentración del extracto de UT se vio un claro incremento en la población de LB.

La relación entre los LTc y los Treg (LTc/Treg) del MT la usó Sato *et al.* para evaluar la prognosis de pacientes de cáncer de ovario y carcinoma urotelial. En tal estudio se concluyó que si el ratio de estas poblaciones se encontraba por encima del tercil inferior, los pacientes contaban con una mejor prognosis<sup>(52)</sup>. Es por tal motivo que se decidió evaluar la relación LTc/Treg en este estudio. No obstante, no se encontró una relación estadísticamente significativa en ninguno de los grupos estudiados (**Tabla 1, Fig. 9**). Este resultado está en concordancia con los porcentajes de LTc y Treg independientes. Al no observar un incremento o disminución estadísticamente significativa en ninguna de las subpoblaciones, era muy poco probable encontrar un resultado favorable en su relación. Como se mencionó antes, es factible que la segunda extracción de UT-POA haya disminuido su capacidad para suscitar otras respuestas biológicas.

Se ha observado en otros estudios que la medición del volumen tumoral es indicativo de una desaceleración del crecimiento del tumor y aunque no necesariamente es un indicador de su desaparición, gran parte de estudios la incluyen como referencia para evaluar tratamientos<sup>(36)</sup>. Como fue mencionado anteriormente, Dreifuss *et al.* demostraron en un modelo de carcinosarcoma la capacidad de un extracto hidroalcohólico de UT de reducir el volumen tumoral significativamente<sup>(37)</sup>. Sin embargo, Dreifuss *et al.*, trabajaron con un simple extracto hidroalcohólico y no uno doble como en el presente trabajo. Además los modelos animales empleados fueron distintos. El modelo de melanoma es un modelo más agresivo, que incluso es conocido por metastatizar al pulmón<sup>(21)</sup>. Nuestros resultados de volumen tumoral no reportan una

disminución estadísticamente significativa (**Fig. 10**). No obstante, en la **Tabla 2** se muestran los resultados de la metástasis. Es importante enfatizar que el modelo elegido para esta investigación es altamente metastásico. En un trabajo realizado por Bobek *et al.* en ratones C57BL/6 con la línea celular B16 observaron que el 100% de sus ratones presentaron metástasis<sup>(21)</sup>. Sin embargo, en la **Tabla 2** observamos que son únicamente los controles (CP, CF) los que presentan casos de metástasis, mientras que los tres grupos de tratamiento (100, 500 y 1000 mg/kg) no presentan casos de metástasis.

En diversos artículos se demuestra la acción de UT sobre el factor de transcripción NF-κB, donde este se encuentra inhibido<sup>(38,39,66)</sup>. Esto se ha asociado a su capacidad pro apoptótica pero además a que la acción de UT no sea precisamente sobre la apoptosis de células tumorales sino sobre la inhibición del ciclo celular. Richmond *et al* en su revisión sobre NF-κB y el melanoma, menciona que la activación de este factor de transcripción promueve la progresión del tumor<sup>(69)</sup>. En este estudio no se evaluó la apoptosis ni el factor NF-κB, pero se podría pensar que si los ratones de los grupos de tratamiento no presentaron metástasis es porque la activación de NF-κB fue inhibida y por lo tanto las células tumorales sufrieron apoptosis o su crecimiento fue inhibido (**Tabla 2**).

Finalmente, aunque los resultados solo indican un incremento de los linfocitos totales y la ausencia de metástasis; este estudio presenta información sobre poblaciones inmunocompetentes en el MT de ratones tratados con UT-POA y presenta información valiosa para futuro estudios con este producto natural.

## 7. CONCLUSIONES

- Las tres dosis evaluadas de UT-POA incrementaron las poblaciones de linfocitos totales (100, 500 y 1000 mg/kg). Se sugiere que UT-POA tenga un efecto positivo sobre otras poblaciones celulares que aún no han sido evaluadas como LB, macrófagos, etc.
- El extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (UT-POA) no incrementa los porcentajes poblacionales de LTh, LTc, el nivel de activación (CD69), la relación LTc/Treg, ni disminuye los porcentajes poblacionales de Treg en el MT.
- La dosis de 500 mg/kg de UT-POA disminuye las poblaciones de LTh dentro del MT; sin embargo el valor de p es tan elevado que consideramos que esa disminución no es lo suficientemente robusta.
- El volumen tumoral no fue afectado, sin embargo los ratones tratados con UT-POA (100, 500 y 1000 mg/kg) no presentaron casos de metástasis.

## 8. RECOMENDACIONES

- Es posible que la potencia de UT-POA se vea afectada por el hecho de haber utilizado no solo la extracción hidroalcohólica sino adicionalmente haber hecho una extracción acuosa al diluir el extracto. Por lo que se recomienda investigar la acción del extracto hidroalcohólico sin la segunda extracción.
- Es posible que incrementando el número de individuos por grupo por encima del "n" calculado, se pueda observar con mayor claridad el efecto de UT-POA en las diversas poblaciones de LT.
- Se recomienda el uso del marcador FoxP3. Con este marcador se podría diferenciar con mayor precisión la población de Tregs.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cook G, Blair G. [Cancer and the immune system](#). Oncogene. 2008;27(45):5868.
2. Kaufmann SHE. [Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff](#). Nat Immunol. 2008;9(7):705–12.
3. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD, Louis S, Burnet FM, Thomas L. [The immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting](#). Immunity. 2004;21:137–48.
4. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. [The three Es of cancer immunoediting](#). Annu Rev Immunol. 2004;22(4):329–60.
5. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. [Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor escape](#). Nat Immunol. 2002;3(11):991–8.
6. OMS. [Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional](#). Organización Mundial de la Salud, [Hong Kong]; 2013.
7. Abdullahi AA. [Trends and challenges of traditional medicine in Africa](#). Afr J Tradit Complement Altern Med. 2011;8(5):115–23.
8. Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. [Natural products for cancer prevention: a global perspective](#). Pharmacol Ther. 2003;99(1):1–13.
9. Herrera Gonzalez NE, Aco Flores AY. [El melanoma en México](#). Rev Espec Médico-Quirúrgicas. 2010;15(3):161–4.
10. Bradford PT. [Skin cancer in skin of color](#). Dermatol Nurs. 2009;21(4):170.
11. C. Wallace H., D. Elder, M Van Horn. [The Biologic Forms of Malignant Melanoma](#). Hum Pathol. 1986;17(5):443–50.
12. Villanueva J, Herlyn M. [Melanoma and the tumor microenvironment](#). Curr Oncol Rep. 2008;10(5):439–46.
13. Polak ME, Borthwick NJ, Gabriel FG, Johnson P, Higgins B, Hurren J, et al. [Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma](#). Br J Cancer. 2007;96(12):1879–87.

14. Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, et al. [Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells](#). *Cancer Immunol Res.* 2013;1(1):32–42.
15. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. [Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade](#). *Science.* 1996;271(5256):1734–6.
16. Quezada S a, Peggs KS. [Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer](#). *Br J Cancer.* 2013;108(8):1560–4.
17. Weber J. [Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events](#). *Oncologist.* 2007;12(7):864–72.
18. Grauer OM, Nierkens S, Bennink E, Toonen LWJ, Boon L, Wesseling P, et al. [CD4+FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo](#). *Int J cancer.* 2007;121(1):95–105.
19. Curran M a, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. [PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors](#). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(9):4275–80.
20. Becker JC, Houben R, Schrama D, Voigt H, Ugurel S, Reisfeld RA. [Mouse models for melanoma: A personal perspective](#). *Exp Dermatol.* 2010;19(2):157–64.
21. Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Kacprzak G, Adamiak J, Kolodziej J, et al. [A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma](#). *Anticancer Res.* 2010;30(12):4799–804.
22. Cheon D. [Mouse models of cancer](#). *Annu Rev Pathol.* 2011;6:95–119.
23. Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. [Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery](#). *Biochem Pharmacol;* 2014;87(1):150–61.



24. Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S. [The Hallmarks of Cancer](#). Cell. 2000;100:57–70.
25. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. [Genetic differences among C57BL/6 substrains](#). Exp Anim. 2009;58(2):141–9.
26. Kruisbeek a M. Commonly used mouse strains. Current protocols in immunology. University of Kentucky. 2001; p. Appendix 1C.
27. Overwijk WW, Restifo NP. [B16 as a mouse model for human melanoma](#). In: Current Protocols of Immunology. 2001. p. 1–33.
28. Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner H. [Uncaria tomentosa \(Willd.\) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results](#). J Ethnopharmacol. 1999;64(1):23–34.
29. Stuppner H, Sturm S, Konwalinka G. [HPLC analysis of the main oxindole alkaloids from Uncaria tomentosa](#). Chromatographia. 1992;34(11-12):597–600.
30. Montoro P, Carbone V, de Dioz Zuniga Quiroz J, De Simone F, Pizza C. [Identification and quantification of components in extracts of Uncaria tomentosa by HPLC-ES/MS](#). Phytochem Anal. 2004;15(1):55–64.
31. Gonçalves C, Dinis T, Batista MT. [Antioxidant properties of proanthocyanidins of Uncaria tomentosa bark decoction: A mechanism for anti-inflammatory activity](#). Phytochemistry. 2005;66(1):89–98.
32. Reinhard KH. [Uncaria tomentosa \(Willd.\) D.C.: Cat's law, Uña de gato, or Savéntaro](#). J Altern Complement Med. 1999;5(2):143–51.
33. Navarro Hoyos M, Sánchez-Patán F, Murillo Masis R, Martín-Álvarez PJ, Zamora Ramirez W, Monagas MJ, et al. [Phenolic Assesment of Uncaria tomentosa L. \(Cat's Claw\): Leaves, Stem, Bark and Wood Extracts](#). Molecule. 2015;20(12):22703–17.
34. Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Reiningger E, et al. [Anti-inflammatory activity of two different extracts of Uncaria tomentosa \(Rubiaceae\)](#). J Ethnopharmacol. 2002;81(2):271–6.
35. Fazio AL, Ballen D, Cesari IM, Abad MJ, Arsenak M, Taylor P. [An](#)

- [ethanolic extract of Uncaria tomentosa reduces inflammation and B16-BL6 melanoma growth in C57BL / 6 mice](#) . Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2008;7(5):217–24.
36. Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Ávila TV, Soley BDS, Rivero AJ, Aguilar JL, et al. [Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw \(Uncaria tomentosa\) \(Willd. Ex Roem. & Schult\) in an in vivo carcinosarcoma model](#). J Ethnopharmacol. 2010;130(1):127–33.
  37. Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Fabossi IA, Lívero FADR, Stolf AM, Alves de Souza CE, et al. [Uncaria tomentosa exerts extensive anti-neoplastic effects against the Walker-256 tumour by modulating oxidative stress and not by alkaloid activity](#). PLoS One [Internet]. 2013;8(2):e54618.
  38. Allen-Hall L, Arnason JT, Cano P, Lafrenie RM. [Uncaria tomentosa acts as a potent TNF- \$\alpha\$  inhibitor through NF- \$\kappa\$ B](#). J Ethnopharmacol. 2010;127(3):685–93.
  39. Åkesson C, Lindgren H, Pero RW, Leanderson T, Ivars F. [An extract of Uncaria tomentosa inhibiting cell division and NF- \$\kappa\$ B activity without inducing cell death](#). Int Immunopharmacol. 2003;3(13-14):1889–900.
  40. Urdanibia I, Michelangeli F, Ruiz MC, Milano B, Taylor P. [Anti-inflammatory and antitumoural effects of Uncaria guianensis bark](#). J Ethnopharmacol. 2013;150(3):1154–62.
  41. Lozada-Requena I, Nuñez C, Alvarez Y, Kahn L, Aguilar JL. [Lymphocyte subsets, dendritic cells and cytokine profiles in mice with melanoma treated with Uncaria tomentosa](#). Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2015;32(4):633-42
  42. Holmes EC. [Immunology of Tumor Infiltrating Lymphocytes](#). Ann Surg. 1985;201(2):158–63.
  43. Cipponi A, Wieers G, Van Baren N, Coulie PG. [Tumor-infiltrating lymphocytes: Apparently good for melanoma patients. but why?](#) Cancer Immunol Immunother. 2011;60(8):1153–60.
  44. Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. [Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment](#). Cancer Microenvironment.

- 2013;6(2):123–33.
45. Kashani-Sabet M. [Tumor progression by immune evasion in melanoma: Role of the programmed cell death-1/programmed cell death-1 ligand 1 interaction.](#) *Cancer*. 2010;116(7):1623–5.
  46. Busam KJ, Antonescu CR, Marghoob A a., Nehal KS, Sachs DL, Shia J, et al. [Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma: A study of interobserver agreement.](#) *Am J Clin Pathol*. 2001;115(6):856–60.
  47. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. [Prognostic Value of TILs in vertical growth phase of primary cutaneous melanoma.](#) *Cancer*. 1996;77(7):1303–10.
  48. Lai Y-P, Jeng C-J, Chen S-C. [The roles of CD4+ T Cells in tumor immunity.](#) *ISRN Immunol*. 2011;2011:1–6.
  49. Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. 189-213 p.
  50. Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, et al. [Tumour-infiltrating CD4+ and CD8+lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma.](#) *Br J Cancer*. 2014;110(10):2560–8.
  51. Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth A a, Gnjatic S, et al. [CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma.](#) *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(10):3967–72.
  52. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. [Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer.](#) *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(51):18538–43.
  53. Vence L, Palucka a K, Fay JW, Ito T, Liu YJ, Banchereau J, et al. [Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma.](#) *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(52):20884–9.
  54. Beyer M, Schultze JL. [Regulatory T cells in cancer.](#) *Blood*. 2006;108(3):804–11.

55. Yu P, Lee Y, Liu W, Krausz T, Chong A, Schreiber H, et al. [Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors](#). J Exp Med. 2005;201(5):779–91.
56. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoi M, Toda M. [Immunologic Self-Tolerance Maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  \$\alpha\$ -chains \(CD25\)](#). J Immunol. 1995;155(95):1151–64.
57. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. [The activation antigen CD69](#). Stem Cells. 1994;12(5):456–65.
58. Langroudi L, Hassan ZM, Ebtekar M, Mahdavi M, Pakravan N, Noori S. [A comparison of low-dose cyclophosphamide treatment with artemisinin treatment in reducing the number of regulatory T cells in murine breast cancer model](#). Int Immunopharmacol. 2010;10(9):1055–61.
59. Lutsiak MEC, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SVS, Schlom J, Sabzevari H. [Inhibition of CD4+25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide](#). Blood. 2005;105(7):2862–8.
60. Charan J, Biswas T. [How to Calculate Sample Size for Different Study Designs in Medical Research?](#) Indian J Psychol Med. 2013;35(2):121–6.
61. Dell RB, Holleran S, Ramakrish R. [Sample Size Determination](#). ILAR J. 2002;43(4):207–13.
62. Tomayko MM, Reynolds CP. [Determination of subcutaneous tumor size in athymic \(nude\) mice\\*](#). Cancer Chemother Pharmacol. 1989;(24):148–54.
63. Watkins SK, Zhu Z, Watkins KE, Hurwitz AA. [Isolation of Immune Cells from Primary Tumors](#). J Vis Exp. 2012;64(e3952):1–5.
64. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Bènard A, Landeghen M Van, Buckner JH, et al. [Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+ CD25- T cells](#). J Clin Invest. 2003;112(9):1437–43.
65. Schowengerdt KO, Fricker FJ, Bahjat KS, Kuntz ST. [Increased expression of the lymphocyte early activation marker CD69 in peripheral](#)

- [blood correlates with histologic evidence of cardiac allograft rejection.](#)  
Transplantation. 2000;69(10):2102–7.
66. Sandoval M, Thompson JH, Zhang X, Liu X, Mannick EE. [Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF-kB.](#) Aliment Pharmacol Ther. 1998;12:1279–89.
67. Kumar KH, Khanum F. [Hydroalcoholic extract of cyperus rotundus ameliorates H2O 2-induced human neuronal cell damage via its anti-oxidative and anti-apoptotic machinery.](#) Cell Mol Neurobiol. 2013;33(1):5–17
68. Domingues A, Sartori A, Valente LMM, Golim MA, Siani AC, Viero RM. [Uncaria tomentosa aqueous-ethanol extract triggers an immunomodulation toward a Th2 cytokine profile.](#) Phyther Res. 2011;25(8):1229–35.
69. Richmond A, Ueda Y. [NF-kB activation in melanoma.](#) Pigment Cell Res. 2006;19(2):112–24

## ANEXOS

### ANEXO 1. Preparación de PBS

Para 1 Litro:

1. 0.23 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (anhydrous; 1,9 mM)
2. 1.15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhydrous; 8.1 mM)
3. 9.00 g  $\text{NaCl}$  (154 mM)
4. Agregar 990 mL de  $\text{H}_2\text{O}$
5. Ajustar al pH deseado (7.2 a 7.4) usando 1M  $\text{NaOH}$  o 1M  $\text{HCl}$
6. Completar hasta 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$

## ANEXO 2. Cantidad de células B16 para la inoculación de los ratones

Se estandarizó el número de células B16 que se necesitan inocular en un ratón para que este desarrolle un tumor de melanoma al cabo de unos días.

Se procedió a descongelar dos crioviales, ambos con la línea celular B16. Unos de los crioviales contenía la línea "ATCC" brindada por el Dr. Abraham Vaisberg y el otro contenía la línea que se identificó como "N" brindada por el Dr. Claudio Acuña desde la Universidad de Santiago de Chile. Ambas se cultivaron en frascos de cultivo en la incubadora (37°C 5% CO<sub>2</sub>) hasta que hubo confluencia mayor al 70%, se tripsinizaron, contaron y resuspendieron en PBS para su posterior inoculación. El inóculo se realizó en 100 µL de PBS.

Se formaron 4 grupos de la siguiente manera:

**Tabla A. Análisis de líneas celulares B16**

Grupo	# de células por inóculo (100 µL)	Línea celular*	# de ratones por grupo
A	5x10 <sup>4</sup>	N	5
B	10 <sup>5</sup>	N	5
C	5x10 <sup>4</sup>	ATCC	5
D	10 <sup>5</sup>	ATCC	5

\*Ambas líneas celulares son B16.

\*\* El área sombreada corresponde al grupo que mostró mejor eficacia.

N= Línea celular de B16 donada por el Dr. Claudio Acuña (Universidad Santiago de Chile); ATCC= línea celular B16 brindada por el Dr. Vaisberg.

Se evaluó qué línea celular y a qué concentración se obtuvo mejores resultados. **El grupo B**, que contenía la línea N, fue el que mostró mayor eficacia a la concentración de 10<sup>5</sup> células en 100 µL de PBS. Hubo mayor aparición de tumores y con mayor rapidez. Se eligió esta línea celular para el estudio.

### ANEXO 3. Medición del tumor con Vernier.





ANEXO 4. Tumor extraído, triturado y procesado con colagenasa.

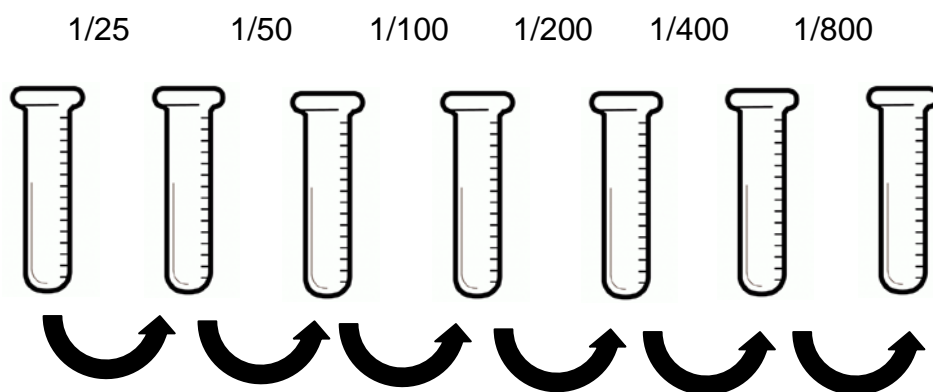


ANEXO 5. Células mononucleares del MT obtenidas mediante gradiente de densidad con Histopaque (flecha).

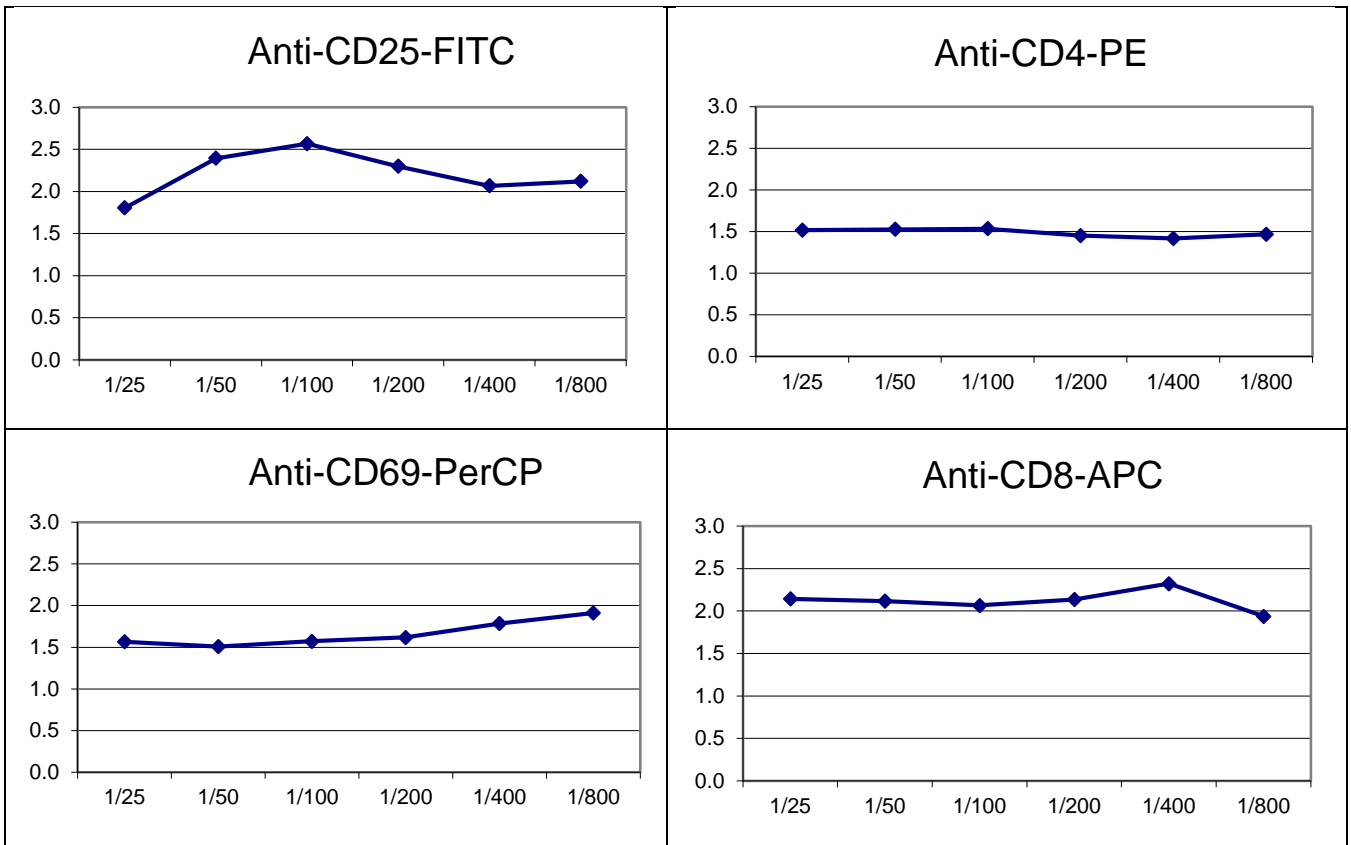


## ANEXO 6. Titulación de anticuerpos monoclonales

Como parte de la estandarización se realizó la titulación de los anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorocromos anti-CD4-PE, anti-CD8a-APC, anti CD69-PerCP y anti-CD25-FITC. La titulación es necesaria para obtener la concentración de anticuerpo óptima para las marcaciones y lecturas en el citómetro. Para este procedimiento se hacen diluciones seriadas de los anticuerpos en buffer de tinción. Se hace una primera dilución agregando 18  $\mu\text{L}$  del anticuerpo a 132  $\mu\text{L}$  del buffer de tinción teniendo como volumen final 150  $\mu\text{L}$ . Luego se hacen diluciones seriadas recogiendo 75  $\mu\text{L}$  del primer tubo y agregándolos al siguiente tubo que contiene otros 75  $\mu\text{L}$  de buffer de tinción y así hasta la dilución 1/800.



Este paso es importante para el control del ruido o “background”. El ruido se origina principalmente por 3 razones; autofluorescencia, superposición espectral o unión inespecífica de anticuerpos. La titulación sirve para definir con qué concentración de anticuerpos uno elimina estos factores de manera más eficiente y la señal se hace más nítida.



**Figura A.** Gráficos representando la relación señal/ruido de cada dilución, para la elección de la dilución óptima.

La titulación se llevó a cabo como un paso previo al análisis de los linfocitos del MT. En el caso del anticuerpo monoclonal CD25-FITC el título fue de 1/100, para anti-CD69-PerCP fue 1/800, anti-CD8a-APC 1/400 y anti-CD4-PE 1/100. Con estos títulos se realiza el marcaje de las células posteriormente.

**Tabla B. Diluciones de los diferentes anticuerpos usados para la titulación.**

Titulación de anticuerpo Anti-CD25-FITC					Titulación de anticuerpo Anti-CD69-PerCP			
	ug/test	Señal (IFM)	Ruido (IFM)	S/R	ug/test	Señal (IFM)	Ruido (IFM)	S/R
1	1/25	139	77	1.8	1/25	83	53	1.6
2	1/50	146	61	2.4	1/50	83	55	1.5
3	1/100	154	60	2.6	1/100	88	56	1.6
4	1/200	138	60	2.3	1/200	89	55	1.6
5	1/400	122	59	2.1	1/400	100	56	1.8
6	1/800	123	58	2.1	1/800	109	57	1.9
Titulación de anticuerpo Anti-CD8a-APC					Titulación de anticuerpo Anti-CD4-PE			
	ug/test	Señal (IFM)	Ruido (IFM)	S/R	ug/test	Señal (IFM)	Ruido (IFM)	S/R
1	1/25	135	63	2.1	1/25	91	60	1.52
2	1/50	127	60	2.1	1/50	93	61	1.52
3	1/100	124	60	2.1	1/100	92	60	1.53
4	1/200	126	59	2.1	1/200	87	60	1.45
5	1/400	137	59	2.3	1/400	85	60	1.42
6	1/800	126	65	1.9	1/800	88	60	1.47

\*Resaltado en azul están las relaciones señal/ruido más altas, por lo que se escogió estos valores como los títulos.

## ANEXO 7. Preparación de Cell Fix

1% Paraformaldehído – PBS pH 7.4

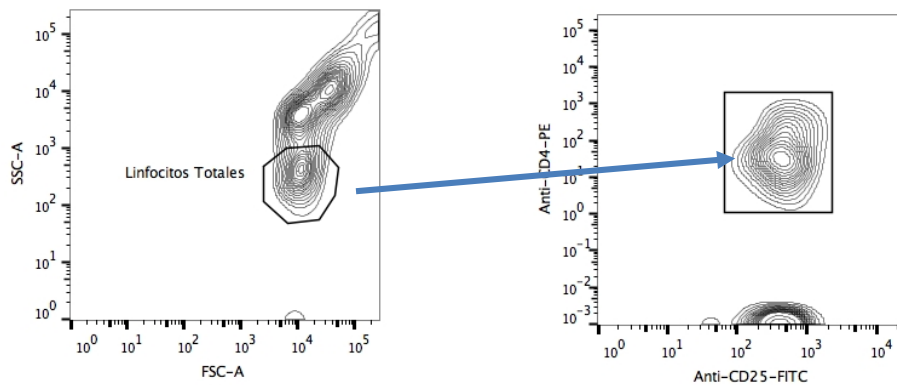
(Grado microscopía electrónica)

2.5 g Paraformaldehído + 247,5 mL PBS pH 7.4

- Se debe disolver en agitador magnético calentando la solución hasta 50°C (controlar con termómetro) por 1 hora.
- Dejar enfriar a TA antes de ajustar el pH.
- Filtrar con filtro 0.22 µm.
- Ajustar el pH a 7.2 con NaOH/HCl.
- Almacenar protegido de la luz a 4°C.

## ANEXO 8. Obtención de linfocitos totales a través de Forward y Side Scatter.

La obtención de linfocitos totales se realizó mediante su tamaño y granularidad usando el Side y Forward Scatter. Luego se procedió a evaluar las subpoblaciones de LTh, LTc y Treg mediante el uso de anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD25 y anti-69 para la activación.



**Figura B. Gráfico de contorno de la citometría de flujo.** A partir de las poblaciones iniciales obtenidas en el citómetro de flujo, se obtiene mediante el uso del Side y Forward Scatter la población de Linfocitos Totales.