



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS  
PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE  
*Uncaria tomentosa* SOBRE LA  
PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS  
DEL OXÍGENO, POLARIZACIÓN DE  
MONOCITOS-MACRÓFAGOS HUMANOS  
M1/M2 Y SOBRE CÉLULAS  
INMUNOCOMPETENTES EN UN  
MODELO DE MELANOMA MURINO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA VIDA

IVÁN LOZADA REQUENA

Lima – Perú

2017



DIRECTOR DE TESIS

PhD PATRICIA HERRERA VELIT

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo va dedicado a Yolanda Requena, donde quiera que estés, por ser mi máximo ejemplo en la vida y porque sin ti nada hubiese sido posible.

A mi esposa Xiomara Rodríguez, por aparecer en el momento indicado y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

Agradezco a todas las personas que me apoyaron durante este trabajo tanto en Toulouse, Francia como en Lima, Perú y en especial a Jose Bernad, Mélissa Prat, Mohamad Alaeddine, Bernard Pipy y Agnès Coste (Francia) y Milagros Pinto, Sandra Jara y José Aguilar (Perú).

## TABLA DE CONTENIDOS

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO CON MONOCITOS-MACRÓFAGOS HUMANOS _____	11
DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO CON LINFOCITOS, CÉLULAS DENDRÍTICAS Y CITOQUINAS EN MELANOMA _____	12
<b>RESUMEN</b> _____	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> _____	<b>15</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b> _____	<b>1</b>
<b>Uncaria tomentosa o Uña de Gato (UT)</b> _____	<b>1</b>
<b>Células inmunocompetentes de importancia en la respuesta inmune y sus propiedades</b> _____	<b>4</b>
<b>Monocitos-macrófagos</b> _____	<b>4</b>
<b>Tipos y polarización de macrófagos</b> _____	<b>8</b>
<b>Polarización de macrófagos y enfermedad</b> _____	<b>11</b>
<b>Productos naturales y macrófagos</b> _____	<b>19</b>
<b>Uncaria tomentosa (Uña de Gato) y monocitos-macrófagos</b> _____	<b>21</b>
<b>Células dendríticas</b> _____	<b>22</b>
<b>Uncaria tomentosa (Uña de Gato), cáncer y células dendríticas</b> _____	<b>27</b>
<b>Linfocitos y citoquinas inmunomoduladoras</b> _____	<b>31</b>
<b>Uncaria tomentosa (Uña de Gato), cáncer, linfocitos y citoquinas</b> _____	<b>34</b>
<b>2. HIPOTESIS</b> _____	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> _____	<b>38</b>
<b>Objetivos Generales</b> _____	<b>38</b>
<b>Objetivos Específicos</b> _____	<b>38</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> _____	<b>40</b>
<b>4.1. Sujetos de investigación humanos</b> _____	<b>40</b>
<b>4.2. Sujetos de investigación animales</b> _____	<b>42</b>
<b>4.3. Preparación del extracto de UT-TOA para ensayos in vitro</b> _____	<b>43</b>
<b>4.4. Preparación del extracto de UT-TOA para los ensayos in vivo</b> _____	<b>44</b>
<b>4.5. Obtención de monocitos-macrófagos humanos adherentes</b> _____	<b>45</b>
<b>4.6. Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT</b> _____	<b>46</b>
<b>4.7. Evaluación de la citotoxicidad mediante la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)</b> _____	<b>50</b>
<b>4.8. Medición de apoptosis con tinción con el colorante 7-aminoactinomicina D (7-AAD) por citometría de flujo</b> _____	<b>54</b>

<b>4.9. Medición de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)</b>	<b>56</b>
<b>4.10. qRT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa)</b>	<b>59</b>
<b>4.10.1. Obtención de monocitos-macrófagos adherentes y tratamiento con UT-TOA</b>	<b>61</b>
<b>4.10.2. Extracción de RNA</b>	<b>61</b>
<b>4.10.3. Transcripción reversa</b>	<b>62</b>
<b>4.10.4. Diluciones del DNAc y RT-PCR</b>	<b>63</b>
<b>4.11. Medición por citometría de flujo de receptores de superficie en monocitos-macrófagos humanos adherentes tratados con UT-TOA</b>	<b>65</b>
<b>4.12. CBA (Cytometric Bead Array) para citoquinas relacionadas a la polarización M1/M2</b>	<b>68</b>
<b>4.13. Cultivo de línea celular B16 e inducción de tumor en ratones C57/BL6</b>	<b>71</b>
<b>4.14. Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)</b>	<b>73</b>
<b>4.15. Aislamiento de células mononucleares del microambiente tumoral (MTMC)</b>	<b>75</b>
<b>4.15.1. Extracción y homogenización del tumor sólido</b>	<b>75</b>
<b>4.15.2. Gradiente de centrifugación</b>	<b>76</b>
<b>4.16. Determinación del porcentaje de linfocitos y células dendríticas por citometría de flujo en PBMC y/o MTMC de ratones con melanoma tratados con UT-TOA</b>	<b>77</b>
<b>4.17. CBA (Cytometric Bead Array) para citoquinas del sobrenadante de cultivo de PBMC y/o MTMC</b>	<b>80</b>
<b>4.18. Análisis estadístico</b>	<b>80</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>82</b>
<b>5.1 Viabilidad celular</b>	<b>82</b>
<b>5.2. Citotoxicidad</b>	<b>83</b>
<b>5.3. Apoptosis</b>	<b>84</b>
<b>5.4. Producción de ROS frente al tratamiento con UT-TOA y estímulos inductores del estallido respiratorio</b>	<b>87</b>
<b>5.5. Producción de ROS frente a estímulo con Candida albicans</b>	<b>97</b>
<b>5.6. Evaluación transcripcional de la polarización M1/M2</b>	<b>97</b>
<b>5.7. Evaluación de los receptores de superficie de monocitos-macrófagos</b>	<b>105</b>
<b>5.8. Evaluación de citoquinas inmunomoduladoras</b>	<b>108</b>

<b>5.9. Relación CD4+/CD8a+ y activación linfocitaria en ratones con melanoma tratados con UT-TOA</b>	<b>109</b>
<b>5.10. Evaluación de otras poblaciones inmunocompetentes en el microambiente tumoral de ratones con melanoma tratados con UT-TOA</b>	<b>115</b>
<b>5.11. Citoquinas sistémicas y del microambiente tumoral de ratones con melanoma tratados con UT-TOA</b>	<b>118</b>
<b>5.12. Correlación entre la relación de linfocitos CD4/CD8a y citoquinas sistémicas en ratones con melanoma tratados con UT-TOA</b>	<b>121</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>123</b>
<b>7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>149</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>152</b>
<b>Anexo 01 - SECUENCIAS DE PRIMERS PARA PCR DE GENES HUMANOS</b>	<b>152</b>
<b>Anexo 02 CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>	<b>154</b>
<b>Anexo 03 - Curvas estándar para citoquinas por CBA</b>	<b>157</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>158</b>

## Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Principales infecciones relacionadas al fenotipo macrófagos M2</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 2. Descarte serológico de infecciones y recuentos celulares</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 3. Características de donantes voluntarios humanos</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 4. Grupos de estudio según diseño experimental</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 5. Curva estándar del ensayo de CBA</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 6. Marcadores utilizados para evaluar poblaciones inmunocompetentes a nivel sistémico (PBMC) y en el microambiente tumoral (MTMC)</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 7. Evaluación transcripcional de la polarización M1/M2 de monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA</i>	<i>104</i>

## Lista de Figuras

<i>Ilustración 1: Diseño Experimental Monocitos-Macrófagos</i>	
<i>Ilustración 2: Diseño Experimental Melanoma Murino</i>	
<i>Figura 1. Modelo multidimensional de activación de macrófagos</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2. Polarización de macrófagos M1 y M2</i>	<i>9</i>
<i>Figura 3. Macrófagos del tejido adiposo (ATM)</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4. Metabolismo de la arginina en mamíferos</i>	<i>18</i>
<i>Figura 5. Metabolismo de la arginina y polarización M1/M2</i>	<i>19</i>
<i>Figura 6. Las DC enlazan la inmunidad innata con la adaptativa</i>	<i>23</i>
<i>Figura 7. Sinapsis inmunológica</i>	<i>25</i>
<i>Figura 8. Diferenciación de células dendríticas</i>	<i>26</i>
<i>Figura 9. Vías de diferenciación y plasticidad de LT</i>	<i>33</i>
<i>Figura 10. Efecto colorimétrico de UT-TOA</i>	<i>47</i>
<i>Figura 11. Determinación de IC50 de UT-TOA por el ensayo de MTT con efecto colorimétrico</i>	<i>48</i>
<i>Figura 12. Ausencia de efecto colorimétrico de UT-TOA</i>	<i>52</i>
<i>Figura 13. Aislamiento de PBMC en sangre de ratones</i>	<i>74</i>
<i>Figura 14. Tumor de melanoma subcutáneo</i>	<i>75</i>

Figura 15. Aislamiento de MTMC.....	77
Figura 16. Determinación de IC50 de UT-TOA por el ensayo de MTT con corrección del efecto colorimétrico.....	82
Figura 17. Citotoxicidad de UT-TOA por el ensayo de LDH. ....	83
Figura 18. Inducción de apoptosis y evaluación de viabilidad celular luego del tratamiento con UT-TOA. Determinación por citometría de flujo con 7-AAD - Gráfica de Citometría.....	85
Figura 19. Inducción de apoptosis y evaluación de viabilidad luego del tratamiento con UT-TOA por 24h determinadas por citometría de flujo con 7-AAD. ....	86
Figura 20. Inducción de apoptosis y evaluación de viabilidad luego del tratamiento con UT-TOA por 48h determinada por citometría de flujo con 7-AAD. ....	87
Figura 21. Producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA. ....	90
Figura 22. Cinética de producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA por 24h y 48h.....	92
Figura 23. Producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA (Relación estímulo/No estímulo).....	94
Figura 24. Producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA (25 y 100ug/mL)..	96
Figura 25. Producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA y estimulados con <i>C. albicans</i> .....	97
Figura 26. Expresión relativa del RNAm de genes relacionados a la polarización M1 de monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA. ....	101
Figura 27. Expresión relativa del RNAm de genes relacionados a la polarización M2 de monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA. ....	103
Figura 28. Estrategia de citometría de flujo para la determinación de marcadores M1/M2 Las poblaciones se definieron en base a controles no marcados para establecer los límites de los cuadrantes, las poblaciones de interés se indican en las flechas. ....	105
Figura 29. Estrategia de citometría de flujo para la determinación de marcadores M1/M2. ....	106
Figura 30. Polarización M1/M2 de monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA.....	107
Figura 31. Cinética de citoquinas inmunomoduladoras producidas por monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA. ....	109
Figura 32. Poblaciones inmunocompetentes en el microambiente tumoral. ....	110
Figura 33. Estrategia de citometría de flujo para la determinación de LT a partir de MTMC.....	111
Figura 34. Estrategia de citometría de flujo para la determinación de LT a partir de PBMC.....	112
Figura 35. Relación de linfocitos T sistémicos y del microambiente tumoral. ....	114
Figura 36. Estrategia de citometría de flujo para la determinación de LT, NK, NKT y células dendríticas a partir de MTMC. ....	115
Figura 37. Porcentajes de poblaciones de linfocitos y células dendríticas en microambiente tumoral. ....	117
Figura 38. Niveles de citoquinas Th1/Th2 en PBMC y MTMC. ....	119
Figura 39. Niveles de citoquinas Th1/Th2/Th17 en PBMC e inflamatorias en MTMC. ....	120
Figura 40. Correlación entre citoquinas y la relación de linfocitos CD4/CD8a. ....	122

## ACRÓNIMOS Y DEFINICIONES

**7-AAD** = 7-aminoactinomicina D  
**ADN** = Ácido desoxirribonucleico  
**ATM** = Macrófago del tejido adiposo  
**CD** = Cluster of differentiation o antígenos de diferenciación  
**Cell fix** = Solución fijadora con 1% de paraformaldehído  
**CN** = Control negativo  
**CPA** = Célula presentadora de antígeno  
**CXCL.../ CCL...** = Nomenclatura para familias de quimioquinas  
**DAMP** = Patrón molecular asociado a muerte celular  
**DC** = Célula dendrítica  
**fMLP** = Péptido quimioatrayente  
**GM-CSF** = Factor estimulante de colonias de granulocitos monocitos  
**HBSS** = Sales de Hanks, solución buffer  
**IC50** = Concentración inhibitoria al 50%, concentración que mata el 50% de células  
**IFM** = Intensidad de fluorescencia media  
**IFN** = Interferón  
**IL** = Interleuquinas  
**iNOS** = Óxido nítrico sintetasa inducible  
**LB** = Linfocito B  
**LDH** = Lactato deshidrogenasa  
**LPS** = Lipopolisácaridos  
**LT** = Linfocito T  
**M1/M2** = Polarización de macrófagos de fenotipo M1 (Clásicos) y M2 (Alternativos)  
**MCP-1** = Proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1  
**MDSC** = Célula supresora de origen mieloide  
**MTC** = Tumorocitotoxicidad mediada por macrófagos  
**MTMC** = Células mononucleares del microambiente tumoral  
**MTT** = Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium  
**NFκB** = Factor de transcripción de varios genes relacionados con la respuesta inmune  
**NK** = Linfocito natural killer o asesino natural  
**NKT** = Subpoblación linfocitaria que comparte marcadores T (CD3) y NK (CD16)  
**PBMC o CMSP** = Células mononucleares de sangre periférica  
**PBS** = Buffer fosfato salino ph 7,2  
**PMA** = Forfol miristato  
**qRT-PCR** = cuantificación por transcripción y reacción en cadena de la polimerasa  
**RNA<sub>m</sub>** = Mensajero del Ácido ribonucleico  
**ROS** = Especies reactivas del oxígeno  
**SFB** = Suero fetal bovino  
**SFM** = Serum free macrophage, medio de cultivo para macrófagos libre de suero SFB conteniendo factores de crecimiento. En el estudio se adiciono SBF al 5%  
**TAM** = Macrófagos asociados al tumor  
**TGF-β** = Factor transformante del crecimiento de tipo beta  
**Th** = Linfocito T helper o ayudador  
**TNF-α** = Factor de necrosis tumoral de tipo alfa  
**URC** = Ácido uncarinico  
**UT** = *Uncaria tomentosa*  
**UT-TOA** = Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales  
**VEGF** = Factor de crecimiento endotelio vascular  
**ZNO** = Zymosan, obtenido de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*

# DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO CON MONOCITOS-MACRÓFAGOS

## HUMANOS

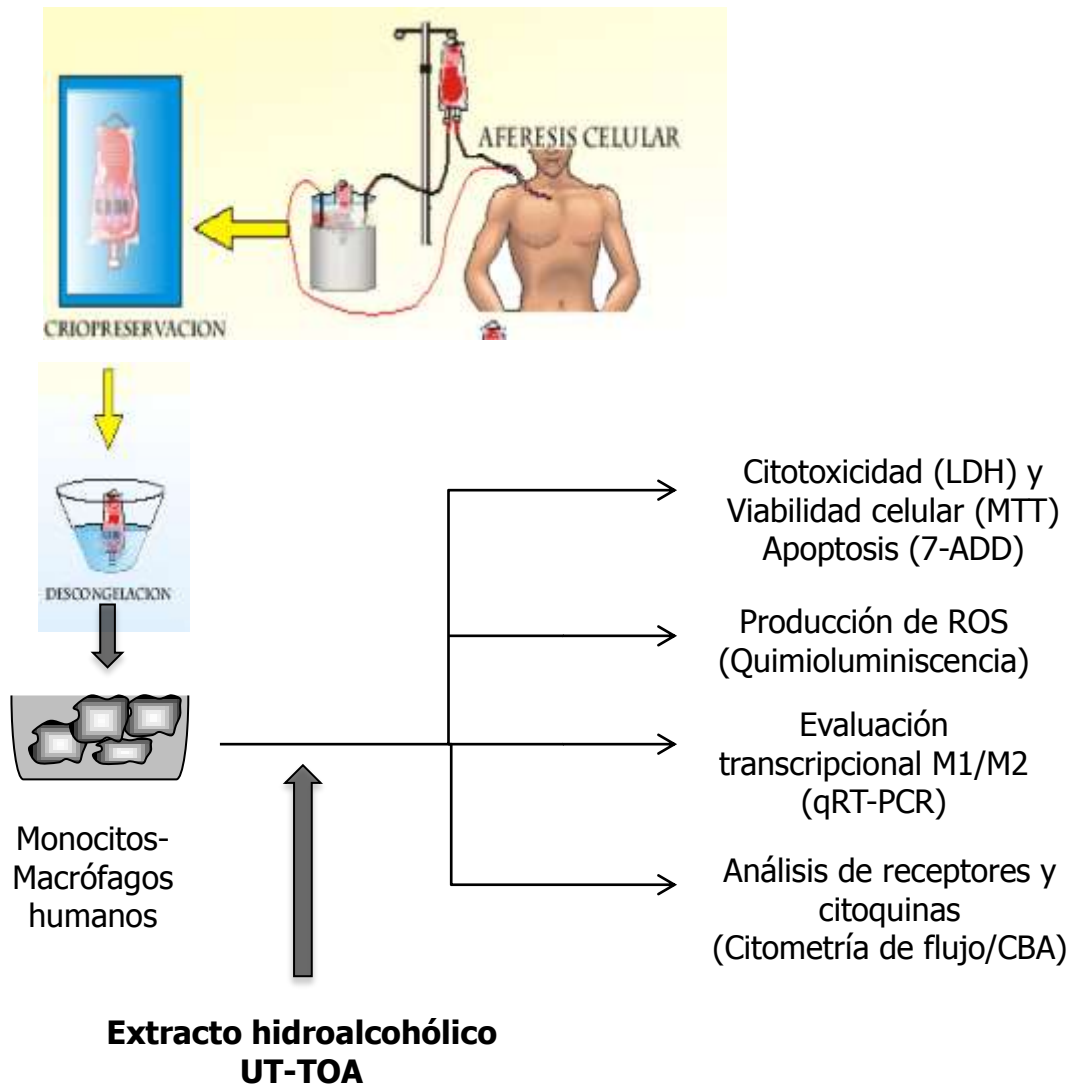


Ilustración 1: Diseño Experimental Monocitos-Macrófagos

DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO CON LINFOCITOS, CÉLULAS DENDRÍTICAS Y CITOQUINAS EN MELANOMA

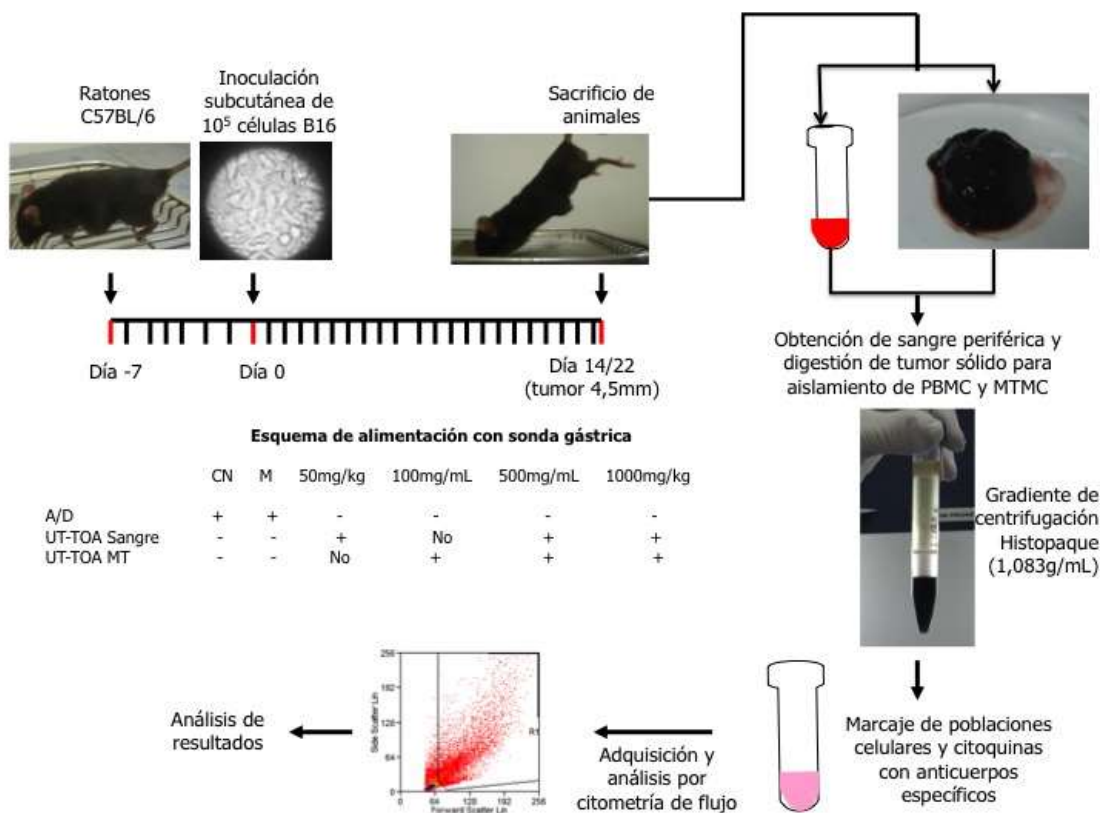


Ilustración 2: Diseño Experimental Melanoma Murino

## RESUMEN

Existen productos naturales con probada capacidad inmunoestimulante, con compuestos químicos actuando en sinergia o de manera individual que son capaces de afectar la actividad de células inmunocompetentes y de ejercer efectos inmunoestimulantes o inmunomoduladores sobre moléculas importantes para la defensa tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La *Uncaria tomentosa* o **Uña de Gato (UT)**, una liana de la selva peruana usada en la medicina tradicional por muchos años tiene probadas propiedades inmunoestimulantes en distintas condiciones incluyendo enfermedades inflamatorias y cáncer. Dentro de los componentes inmunocompetentes se encuentran los monocitos-macrófagos, células dendríticas y las poblaciones linfocitarias quienes participan activamente en la inmunidad innata y adaptativa. Asimismo, las citoquinas producidas por estas células promueven la comunicación celular y la ejecución de mecanismos importantes para la defensa.

En este estudio experimental in vitro se ha demostrado que el extracto de UT en monocitos-macrófagos de humanos sanos no altera la viabilidad; no es citotóxico; ni induce apoptosis entre 6,25 – 100ug/mL y que a 25ug/mL desencadena el incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que podría mejorar la actividad microbicida contra *C. albicans*; induce una polarización M2 que transita hacia una mixta M1/M2 a nivel transcripcional y proteómico, es decir, receptores de reconocimiento, citoquinas y quimioquinas. Interesantemente, UT-TOA logró incrementar la producción de IFN- $\gamma$  siendo posible que los monocitos-macrófagos mejoren su capacidad inmunoestimulante. Además, la evaluación de células inmunocompetentes y sus citoquinas en un modelo de melanoma en ratones demostró una mejor actividad de UT-TOA a nivel sistémico que en el microambiente tumoral donde a 1000mg/kg se incrementa la relación CD4/CD8a incluyendo el nivel de

activación (CD44) sobretodo a 50 y 500mg/kg y además se incrementa la producción de la citoquina Th1 (TNF- $\alpha$ ); mientras que la citoquina Th17 (IL-17A) disminuye existiendo una tendencia de correlación entre la relación de linfocitos y ambas citoquinas. El único parámetro que dio una respuesta positiva en el microambiente tumoral es el incremento del porcentaje de células dendríticas mieloides. Tomados juntos todos los resultados concluimos que el extracto de UT-TOA podría tener una actividad inmunoestimulante sobre células inmunocompetentes y sus citoquinas en condiciones de normalidad y de enfermedad (modelo de melanoma), lo cual abre nuevas avenidas en el estudio de este producto natural.

**Palabras clave:** Uncaria, polarización M1/M2, ROS, citoquinas, receptores de reconocimiento, monocitos-macrófagos, linfocitos, células dendríticas, melanoma.

## **ABSTRACT**

There are natural products with proven immunostimulatory properties, with synergistic or isolated chemical compounds that are capable of affecting the activity of immunocompetent cells and exerting immunostimulatory or immunomodulatory effects over molecules important for defense in both physiological and pathological conditions. *Uncaria tomentosa* or Uña de Gato (UT), a Peruvian rainforest liana used in traditional medicine for many years has proven immunostimulating properties under different conditions including inflammatory diseases and cancer. Within of immunocompetent components are monocyte-macrophage, dendritic cells and lymphocyte subsets who are actively involved in innate and adaptive immunity. Also, cytokines produced by these cells promote cellular communication and the execution of mechanisms important for defense.

In this in vitro experimental study it has been demonstrated that the UT extract in monocytes-macrophages healthy human does not alter the viability; it is not cytotoxic; neither induces apoptosis between 6.25 - 100ug / mL and that at 25ug/mL triggers the increase of the production of reactive oxygen species (ROS) that could improve the microbicidal activity against *C. albicans*; induces an M2 polarization that transits to a mixed M1 / M2 at the transcriptional level and at the proteomic level, that is, recognition receptors, cytokines and chemokines. Interestingly, UT-TOA was able to increase IFN- $\gamma$  production, making it possible for monocytes-macrophages to improve their immunostimulatory capacity. The evaluation of immunocompetent cells and their cytokines in a melanoma model in mice showed a better activity of UT-TOA at systemic level than in tumor microenvironment where at 1000mg/kg the CD4 / CD8a

ratio increases, including the activation level (CD44), above all at 50 and 500mg / kg. In addition, the production of the Th1 (TNF - $\alpha$ ) cytokine is increased; while the Th17 (IL17A) cytokine response decreases with a correlation tendency between the ratio of lymphocytes and both cytokines. The only parameter that gave a positive response in the tumor microenvironment is the increase in the percentage of myeloid dendritic cells. Taken together all the results we conclude that UT-TOA extract could have an immunostimulating activity over immunocompetent cells and their cytokines under conditions of normality and disease (melanoma model), which opens new avenues in the study of this natural product.

Key words: Uncaria, M1/M2 polarization, ROS, cytokines, recognition receptors, monocyte-macrophages, lymphocytes, dendritic cells, melanoma.

## **1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

El rol principal del sistema inmune es mantener la homeostasis de un organismo tal cual lo hacen los sistemas endocrino, digestivo, respiratorio y nervioso. Para cumplir con este objetivo el sistema inmune se vale de órganos, tejidos, células y las moléculas que estas últimas expresan. Dentro de las células inmunocompetentes que casi siempre participan en una respuesta inmune están los grupos de monocitos (incluyendo a macrófagos y células dendríticas), granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastocitos) y linfocitos (T, B, NK y sus subpoblaciones). En general, podemos indicar que las respuestas innatas y adaptativas donde participan estas células lo hacen de manera cooperativa donde células como los macrófagos y las células dendríticas suelen ser el nexo entre ambos tipos de respuesta. Por tanto, resulta importante conocer un poco más sobre su función, sobretodo porque el incrementado interés sobre el estudio de los productos naturales indica que podrían ejercer un efecto inmunoestimulante que potencie la actividad biológica de estas células. En ese sentido este estudio pretende obtener información sobre la actividad biológica de un grupo de estas células inmunocompetentes tras el tratamiento con un extracto estandarizado de *Uncaria tomentosa* o Uña de Gato (UT), una planta oriunda del Perú, utilizando modelos in vitro humanos e in vivo de ratones de laboratorio.

### ***Uncaria tomentosa o Uña de Gato (UT)***

UT es una liana oriunda de la selva amazónica peruana, usada por primera vez por los Ashaninka, esta planta medicinal es consumida principalmente en forma de una infusión preparada a partir de la corteza de la planta. Las tribus nativas de

Perú la utilizan para enfermedades tales como el asma, inflamaciones del tracto urinario, tumores y diabetes (1). En los últimos 20 años se han aislado cerca de 50 compuestos de los cuales 35 se consideran exclusivos de esta planta, dentro de sus metabolitos secundarios se encuentran flavonoides, incluyendo cuatro estructuras desconocidas de dímeros de propelargonidina reportados por primera vez (2), taninos (3), procianidinas (4), triterpenos (5,6), esteroides (7), alcaloides (8), glicósidos del ácido quinóico (6), y ácido quínico (9) y aunque uno de los principales metabolitos utilizados como marcadores sean los alcaloides muchos investigadores concluyen que todos los compuestos estarían actuando en sinergia al momento de evaluar un efecto biológico (10). Durante muchos años se ha demostrado sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (11–17). Sandoval-Chacon M et al demostraron la actividad antioxidante, a través de la inhibición de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en células de adenocarcinoma de colon (HT29) y la actividad antiinflamatoria, a través de la inhibición del factor de transcripción NFkB en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. En ambos casos se usó 100ug/mL de un extracto acuoso de la corteza de UT obtenido en Tingo María (Perú), el que contenía pteropodina, isopteropodina, mitrafilina e isomitrafilina siguiendo la metodología de cuantificación de alcaloides de Laus G et al (16,18). El mismo Sandoval-Chacón M et al, utilizando un extracto acuoso de UT en dos tipos de preparaciones: liofilizada y micropulverizada demostró en el modelo de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS y tratados con estos extractos que se producía la inhibición de la citoquina TNF- $\alpha$ , asimismo en estos mismos macrófagos RAW 264.7 demostró la actividad antioxidante a través de la inhibición de la pérdida de

viabilidad celular inducida por el radical libre DPPH (1,1-diphenyl- 2-picrilhydrazyl) (15). Existen estudios en los que se utilizan extractos hidroalcohólicos de UT que demuestran similares propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, por ejemplo Aguilar JL et al demostraron in vivo e in vitro la actividad antiinflamatoria, en el primer caso utilizando el modelo de edema plantar se encontró que 50mg/kg de un extracto hidroalcohólico conteniendo 5,61% de alcaloides oxindólicos totales inhibió mejor la inflamación que 200mg/kg del extracto acuoso con 0,26% de alcaloides oxindólicos; en el segundo caso, el extracto hidroalcohólico (500ug/mL) inhibió mejor la unión del factor nuclear NFkB al ADN que el extracto acuoso en el cultivo de células Jurkat. Adicionalmente, la inhibición de la enzima ciclooxygenasa-2 fue mejor inhibida por 50ug/mL del extracto hidroalcohólico con lo cual se reafirmaba el efecto antiinflamatorio (13). En el año 2010, Dreiffus AA et al usando el mismo extracto hidroalcohólico de UT-TOA de nuestro estudio demostró su actividad antioxidante ante el compuesto DPPH en el rango de 1 – 100ug/mL. Además, en el modelo de carcinosarcoma con células Walker 256 también demostró la actividad antioxidante y antitumoral de UT-TOA a través de la reducción de la actividad de la SOD (superóxido dismutasa) y catalasa hepáticas y tumorales a la concentración de 100mg/kg, lo que contribuye a la regulación de los mecanismos que implican la participación de la especies reactivas del oxígeno (ROS), es decir, a menor actividad de enzimas oxidantes mayor efecto proapoptótico de ROS sobre las células malignas (19). En el 2013, Dreiffus AA et al evaluaron nuevamente la actividad antioxidante y antitumoral del extracto UT-TOA pero esta vez no sólo usaron el extracto hidroalcohólico en bruto sino también su

fracción butanólica (BuOH), rica en proantocianidinas y compuestos fenólicos, así como también ácido cafeico y sus derivados y su fracción clorofórmica (CHCl<sub>3</sub>), rica en triterpenos, glicósidos y alcaloides oxindólicos pentacíclicos como especiofilina, uncarina F, mitrafilina, isomitrafilina, pteropodina e isopteropodina. Tanto el extracto bruto de UT-TOA como la fracción BuOH demostraron actividad antioxidante ante el compuesto DPPH en el rango 1 – 300ug/mL y 0,5 – 150ug/mL, respectivamente. A nivel hepático y del tejido tumoral el extracto bruto UT-TOA y la fracción BuOH presentaron efectos opuestos sobre la actividad de la SOD, mientras que el hígado ambos extractos incrementaban la SOD en el tejido tumoral se producía una disminución. En el caso de la catalasa ocurría lo mismo pero solo con el extracto bruto de UT-TOA. La baja acción antioxidante de la fracción CHCl<sub>3</sub> es un indicativo de que los diferentes compuestos de esta planta podrían requerir actuar en sinergia para lograr un efecto biológico significativo (20).

## **Células inmunocompetentes de importancia en la respuesta inmune y sus propiedades**

### **Monocitos-macrófagos**

Las antiguas definiciones sobre la activación de los macrófagos derivados de monocitos se basan en dos modelos, que dependiendo de la respuesta a señales generadas **in vitro**, dividen a los macrófagos según si son activados por la vía clásica o por la vía alternativa; sin embargo, los estudios **in vivo** relacionados con su comportamiento en enfermedades, su fenotipo según tejidos específicos, sus diferentes orígenes y la data obtenida de estudios de transcriptómica y epigenética

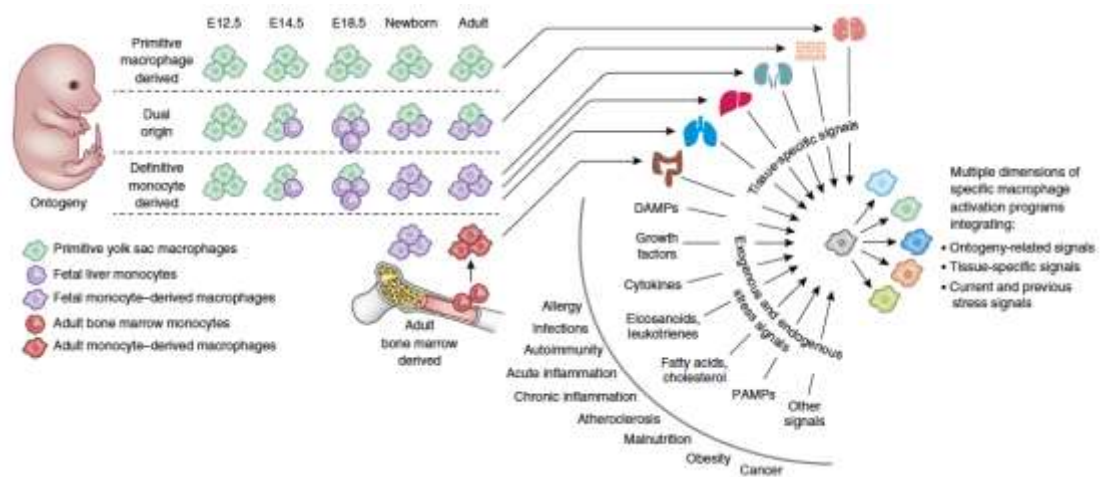
merecen una evaluación de estos dos estados de activación (21). El objetivo final de estas evaluaciones siempre será generar nuevos conceptos que puedan influir en las estrategias terapéuticas clínicas que tengan por blanco a células como los macrófagos.

Asimismo, son características claves de los macrófagos su gran heterogeneidad y plasticidad de fenotipo y función, las que les permiten participar en respuestas contra patógenos desde el punto de vista inmunológico (inflamación) o en el desarrollo embrionario, a través del reconocimiento de células apoptóticas y eferocitosis (fagocitosis de restos apoptóticos) (22–25) o frente a señales homeostáticas para inducir la remodelación y reparación de tejidos, por ejemplo, los macrófagos alveolares regulan el surfactante pulmonar, mientras que los osteoclastos promueven la resorción del hueso y los macrófagos de la pulpa roja en el bazo promueven la remoción de los glóbulos rojos y regulan el reciclamiento del hierro (26). Todo esto se da en un contexto que depende del tipo de señales que son diversas y que se las encuentran de una manera temporal y espacialmente dinámica en lo que sería su microambiente específico (25,27).

En los años 1970s se describieron por primera vez los macrófagos activados clásicamente (M1) debido a su respuesta a citoquinas inflamatorias tipo 1 y a productos microbianos (28). Desde comienzos de los 1990s se han venido usando varios términos para definir el estado de activación de los macrófagos, basados sobretudo en los efectos diferenciales de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) y/o los lipopolisacáridos (LPS) e interleuquina-4 (IL-4) sobre la expresión de genes de estas células; así IFN- $\gamma$ /LPS inducen una activación clásica e IL-4 una activación alternativa de los macrófagos (29). En el 2012 Mills y sus colegas plantearon la

definición M1-M2 basados en la acción de los macrófagos frente a un patógeno o un tejido dañado, en la que deben decidir eliminarlo (Fight) o repararlo (Fix), respectivamente. Las moléculas implicadas en la eliminación son el óxido nítrico (NO) que inhibe la proliferación y la ornitina que promueve la proliferación y reparación (30). Una tercera nomenclatura apareció a partir de la población M2 y se hablaba de macrófagos M2a, M2b, M2c y M2d basados en diferentes escenarios de activación (IL-4, IL-13, inmunocomplejos de inmunoglobulinas-Ig, LPS, IL-10, TGF- $\beta$ , glucocorticoides GC, adenosina) (31,32); sin embargo, esta nomenclatura no ha sido del todo aceptada por el hecho de que la activación ocurre en un amplio espectro de estímulos y no se pueden crear grupos para unos pocos estímulos conocidos, en otras palabras estos estímulos no siempre son a los que se enfrenta un macrófago en condiciones fisiológicas o patológicas (29). Una cuarta nomenclatura divide a los macrófagos en función de un factor de crecimiento, siendo el GM-CSF-1 (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) el factor que diferencia a los M1 y el CSF-1 para los M2; sin embargo, no hay una completa evidencia para esta asignación (29). Actualmente se intenta seguir los lineamientos de un grupo de investigadores líderes en el campo del estudio de la activación y polarización de macrófagos, quienes en un consenso logrado en el congreso internacional de inmunología del 2013 en Milán, Italia recomiendan que se describan los escenarios de activación, es decir, se habla de un modelo de activación multidimensional, el que integra las señales relacionadas a la ontogenia, tejido específicas y señales de estrés del momento o anteriores (Fig. 1) y que se adopte una nomenclatura ligada a los estándares de activación, como por ejemplo M(IL-4), M(Ig), M(IL-10), M(GC), M(IFN- $\gamma$ ),

M(LPS)(21,29). Con todo esto existen aún investigadores que siguen utilizando la terminología M1-M2 para referirse a dichos estados de polarización de macrófagos.



**Figura 1. Modelo multidimensional de activación de macrófagos.**

Tomado de Ginhoux F et al 2016 Ref. (21). En este modelo interactúan ontogénesis, microambiente tisular local y señales de estrés para dar lugar a la respuesta de macrófagos a la activación. A nivel de ontogénesis los macrófagos de diversos tejidos se derivan del saco vitelino (microglía); del monocito hepático fetal (macrófagos alveolares en el pulmón y células de Kupffer en el hígado); de saco vitelino y de monocitos hepáticos fetales (células de Langerhans en epidermis) o reemplazados después del nacimiento con monocitos adultos de médula ósea (intestino, corazón y macrófagos dérmicos). Las señales ambientales específicas del tejido son importantes impulsores de la activación de los macrófagos durante la homeostasis del tejido adulto. Una vez que se produce un ataque en el tejido y se elevan las señales de estrés en el entorno tisular, estas nuevas señales se integran adicionalmente en el programa respectivo. Es importante destacar que las mismas señales de estrés con la misma cinética darán como resultado diferentes resultados en macrófagos de diferentes orígenes. Además, la exposición previa a las señales de estrés también afectará la activación de los macrófagos en respuesta a la exposición a la señal de tensión en un momento posterior. "E" significa días de desarrollo embrionario.

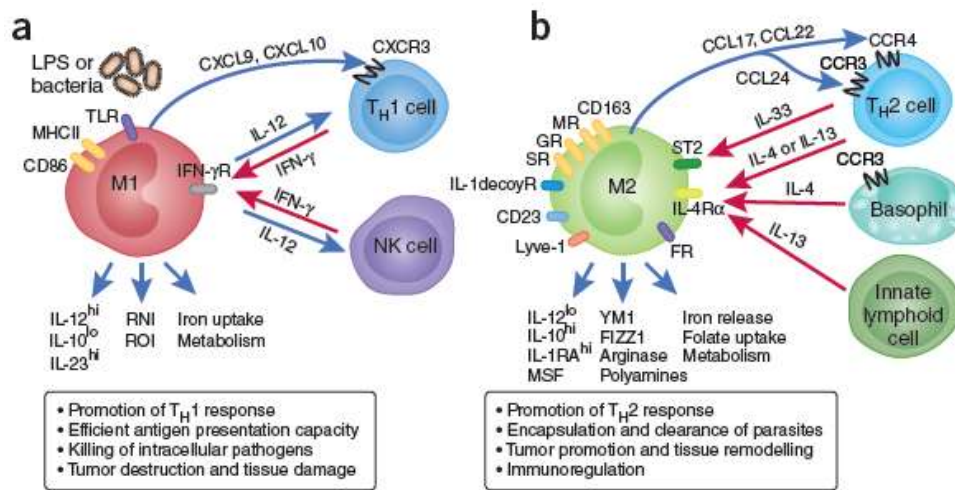
Normalmente bajo condiciones no inflamatorias los macrófagos residentes en los tejidos muestran un fenotipo M2 que promueve la homeostasis y reparación del tejido; sin embargo tras las infecciones los macrófagos adquieren un fenotipo M1 debido a la unión de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) a patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs), como por ejemplo los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, de tal manera que estas células producirán especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) y citoquinas

inflamatorias que aumentarán la capacidad microbicida (21). Alternativamente durante la resolución de la inflamación los macrófagos vuelven a un fenotipo M2 para promover la eliminación de los detritus, inhibir la producción de mediadores inflamatorios y restaurar la homeostasis de los tejidos. En general, los macrófagos M2 producen citoquinas anti-inflamatorias y expresan receptores endocíticos y se encargan de promover la eliminación de células apoptóticas, la proliferación y la cicatrización, por tanto se podría decir que los macrófagos tienen una gran versatilidad (26,31).

### **Tipos y polarización de macrófagos**

Al igual que ocurrió en la década de los ochenta con el paradigma de los linfocitos T (LT) helper tipo 1 y 2 (Th1/Th2), años más tarde se estableció un nuevo paradigma que es un reflejo de la polarización de los LT y se refiere a los dos estados de activación de los macrófagos, es decir, el fenotipo de **macrófagos activados clásicamente o M1** y el de **macrófagos activados alternativamente o M2**. Se habla de un reflejo o "espejo" porque citoquinas Th1 como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) o antígenos bacterianos como LPS son capaces de polarizar a los macrófagos a un fenotipo M1 y porque originalmente se atribuye la polarización M2 a citoquinas provenientes de linfocitos Th2 como la interleuquina 4 (IL-4). Actualmente sabemos que el IFN- $\gamma$  no sólo proviene de Th1 sino también de linfocitos Th17 y natural killer (NK) y que además de la IL-4, también la IL-13 y IL-33, producidas por basófilos, células helper naturales, nuocitos y células progenitoras multipotentes tipo 2, son capaces de inducir un perfil M2 (Fig. 2) (21,26,33,34). La polarización en la dirección contraria también es posible dado

que los macrófagos son capaces de producir citoquinas como IFN- $\gamma$ , IL-4 o IL-17 con lo cual tras su polarización M1 o M2 también podrían influenciar en la polarización Th1/Th2/Th17(35,36).



**Figura 2. Polarización de macrófagos M1 y M2.**

Tomado de Biswas SK et al 2010 Ref. (37). (a) Macrófagos polarizados M1 y su comunicación con linfocitos Th1 y NK. (b) Polarización de macrófagos M2 dirigida por linfocitos Th2, basófilos y células linfocíticas innatas a través de la secreción de IL-4, IL-13 o IL-33.

Fisiológicamente los **macrófagos M1** que participan en la promoción de la respuesta Th1, cuentan con un fenotipo pro-inflamatorio (productor de IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ ), tienen una eficiente capacidad de presentación de antígenos, contribuyen a la eliminación de patógenos intracelulares y promueven la destrucción tumoral y el daño al tejido; mientras que los **macrófagos M2** promueven la respuesta Th2, encapsulan y eliminan sobretodo parásitos, promueven el crecimiento tumoral y la remodelación de tejidos y tienen capacidad inmunoreguladora (31,33,38). Asimismo, ambas poblaciones de macrófagos se distinguen por la expresión diferencial de diversas moléculas como por ejemplo iNOS (Oxido nítrico sintetasa inducible) que convierte la L-arginina a L-citrulina

y óxido nítrico (NO) en los M1 y la Arginasa I que cataboliza a L-arginina a L-ornitina un precursor de poliaminas y prolinas en los M2 (26,33); ambas utilizan mecanismos de atracción de células inmunes dirigidos por quimioquinas, las que asegurarán el contacto célula-célula, por tanto el quimioquinoma es diferente para cada tipo de macrófagos, por ejemplo los M1 producen CXCL9 y CXCL10 para atraer a los Th1; mientras que los M2 producen CCL17, CCL22 y CCL24 para atraer a los Th2 (Figura 2) (33,38). Estudios en condiciones inmunopatológicas humanas como la mononucleosis infecciosa y la enfermedad de Crohn identificaron a macrófagos M1 como CD68<sup>+</sup>pSTAT1<sup>+</sup> y CD163<sup>+</sup>pSTAT1<sup>+</sup> y en presencia de pólipos nasales alérgicos y cicatrización a macrófagos M2 como CD68<sup>+</sup>CMAF<sup>+</sup> y CD163<sup>+</sup>CMAF<sup>+</sup>, en ambos casos la polarización se determinó en función de la presencia de factores (STAT1 y CMAF) que regulan la expresión de citoquinas provenientes del patrón M1(IFN- $\gamma$ )/M2(IL-10) (38). De esta manera los macrófagos tienen una heterogeneidad que es probablemente un reflejo de la plasticidad y versatilidad de estas células en respuesta a la exposición a señales ambientales (31,39).

Por otro lado, tras el reconocimiento de microbios los macrófagos producen grandes cantidades de moléculas de reconocimiento de patrones (PRR) pero en fase soluble (lectinas de unión a la manosa, ficolinas y pentraxinas), estas moléculas serían los ancestros funcionales de los anticuerpos y desatarían mecanismos efectores como el reconocimiento del patógeno, la activación del sistema de complemento y la opsonización (33).

## **Polarización de macrófagos y enfermedad**

No es sorprendente que algunas aberraciones en la polarización de los macrófagos estén asociadas con algo de la patología observada en los procesos de cicatrización, diabetes, distrofia muscular, enfermedades fibroproliferativas como la artritis y fibrosis pulmonar, así como también con la progresión del tumor (31). Las investigaciones demuestran la implicancia del proceso inflamatorio en enfermedades neurodegenerativas (Esclerosis múltiple, Alzheimer y Parkinson ) y desordenes metabólicos (Aterosclerosis, Diabetes tipo 2 y Obesidad). En estos casos la inflamación es inducida por los macrófagos a través de la activación del inflamasoma y subsecuente producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y IL-18 (40–45). Heneka MT et al 2012, demostró en ratones que la deficiencia del inflamasoma NLRP3 polariza a la microglía a un fenotipo M2 que mejora la regeneración del tejido, por tanto el eje NLRP3-Caspasa1 en los macrófagos o microglía es un potencial blanco terapéutico para la Enfermedad de Alzheimer (44). Tampoco es sorprendente que en otras condiciones homeostáticas o patológicas como los macrófagos embrionarios, macrófagos de fase de resolución y macrófagos de muchos tipos de cáncer demuestren un claro fenotipo o M1 o M2 (21). La polarización M1 usualmente esta asociada con protección durante enfermedades infecciosas agudas. Por ejemplo, *Listeria monocitogenes*, que causa enfermedad en pacientes inmunocomprometidos y mujeres embarazadas, induce una respuesta M1 evitando el escape bacteriano del fagosoma y estimulando su eliminación intracelular (28). El análisis del transcriptoma de macrófagos de ratón en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis* revela la expresión de los genes de IFN- $\gamma$ , lo que corresponde a un programa M1 sobre todo durante la fase temprana

de la infección y esto se correlaciona con la data clínica colectada en pacientes con tuberculosis activa donde lamentablemente algunos pacientes presentan una polarización M2 en un intento de la infección por atenuar su erradicación, lo que se traduce en bajo nivel de defensa (28). Asimismo, se ha evidenciado que los M1 se ubican hacia la parte central del granuloma cerca de bacterias viables; mientras que los M2 se encuentran más hacia la zona externa de cicatrización de este granuloma (46).

Las respuestas frente a gusanos nematodos y trematodos como *Toxocara*, *Schistosoma* y *Taenia* inducen una respuesta Th2 en la que las citoquinas IL-4 y IL-13 que producen inducen una fuerte respuesta M2 en los macrófagos. Como se puede apreciar en la tabla 1 existen varias infecciones en las que debiendo ser la respuesta de defensa la polarización M1, los patógenos inducen una polarización M2 como mecanismo de evasión (32).

**Tabla 1. Principales infecciones relacionadas al fenotipo macrófagos M2**

Ref. (32). Marcadores genéticos típicos de ratones que se expresan para el fenotipo M2 frente a infecciones por parásitos, bacterias, virus y hongos.

Infección	M2 (Marcadores genéticos)
<p><b>Helmintos y parásitos extracelulares: Requieren respuesta Th2 para eliminar la infección</b></p> <p><i>Schistosoma mansoni</i></p> <p><i>Taenia crassiceps</i></p>	<p>Arg1,MR, Fizz1, Ym1, IL-10,TGFβ</p> <p>Arg1,MR, Fizz1, Ym1</p>
<p><b>Bacterias: Requieren respuesta Th1/Th17 para eliminar la infección</b></p> <p><i>Mycobacterium tuberculosis</i></p> <p><i>Mycobacterium bovis (BCG)</i></p> <p><i>Helicobacter pylori</i></p>	<p>Arg1,MR, IL-10, IL-1Ra</p> <p>Arg1</p> <p>Arg2</p>
<p><b>Virus: Requieren respuesta Th1 para eliminar la infección</b></p> <p>Influenza A</p> <p>Coxsackievirus B3</p>	<p>Arg1</p> <p>Arg1, MR, Ym1, IL-10, IL-1</p>
<p><b>Otros:</b></p> <p><i>Candida albicans</i></p> <p><i>Trypanosoma cruzi</i></p> <p><i>Toxoplasma gondii</i></p>	<p>MR, Dectine-1</p> <p>Arg1</p> <p>Arg1</p>

Arg1: Arginasa 1; MR: Receptor de Manosa

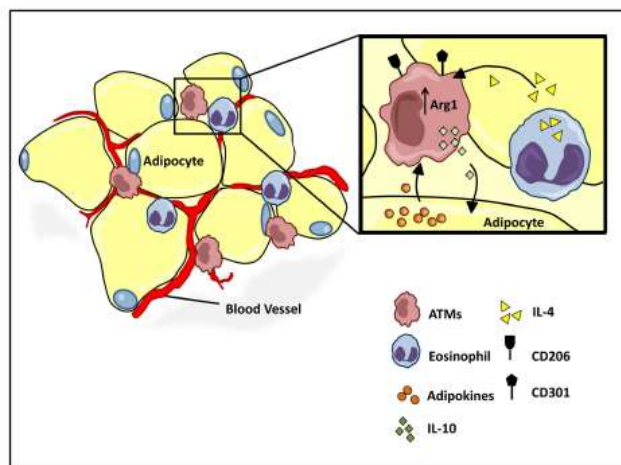
Fadini GP et al. 2013 demostraron que en la diabetes tipo 2 existía una marcada disminución de la población de macrófagos M2; mientras que los M1 no se modificaban comparados a los de sujetos control sanos; sin embargo, considerando que la diabetes tipo 2 es una condición pro-inflamatoria resulta sorprendente que exista un déficit de macrófagos anti-inflamatorios o M2 y no un

incremento de macrófagos pro-inflamatorios o M1. Asimismo, en estos pacientes la polarización M1/M2 se correlacionó directamente con la circunferencia abdominal (indicador de obesidad) y resistencia a la insulina y a hemoglobina (indicadores del control de glucosa); por tanto la polarización M1/M2 puede ser considerada como un biomarcador de inflamación metabólica en pacientes diabéticos (47).

Los macrófagos del hígado o células de Kupffer son importantes en el mantenimiento de la homeostasis, remodelación de tejidos y regulación de la función metabólica del hígado(48). Debido a su constante exposición a antígenos alimentarios provenientes de la sangre y a los productos bacterianos de la flora intestinal comensal estas células son requeridas para prevenir el ataque de la inflamación debida a estos estímulos no patogénicos. En este caso los macrófagos infiltrantes son inicialmente  $CD11b^+F4/80^+$  y luego se diferencian a células maduras  $CD11b^{Low}F4/80^{High}$ . La enfermedad del hígado graso no alcohólico es la más común junto con la obesidad. Esta condición clínico-patológica se caracteriza por la acumulación de lípidos en los hepatocitos que pueden llevar a formas leves como la esteatosis hasta graves como la cirrosis, cáncer hepático y fallas hepáticas. En respuesta a la obesidad, que a través del tejido adiposo secreta citoquinas, adipoquinas y ácidos grasos, las células de Kupffer inducen un fenotipo M1, la muerte de los hepatocitos genera patrones moleculares asociados a muerte (DAMPs) que terminan de promover la polarización de los macrófagos en el hígado (26).

La obesidad es un estadio de enfermedad de tipo inflamatorio crónico donde prevalece el fenotipo M1 (47). Individuos delgados en estadio no inflamatorio

tienen aproximadamente 10 – 15 % de macrófagos de tejido adiposo (ATM) y son uniformemente macrófagos M2, este estadio es mantenido por la acción sinérgica de eosinófilos que secretan IL-4 y adipocitos sanos que producen adiponectina, a su vez los ATM secretan IL-10 que regula la homeostasis de la glucosa dentro del tejido adiposo y tejidos sistémicos incluyendo el músculo (Figura 3). La existencia de un ambiente inflamatorio creado por la secreción de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6 producidas por adipocitos estresados, producto de dietas altas en grasa, atrae a macrófagos M1-ATM (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) que mantienen el estadio pro-inflamatorio a través de la secreción de iNOS y TNF- $\alpha$  (26).



**Figura 3. Macrófagos del tejido adiposo (ATM).**

Ref. (26). El tejido adiposo sano contiene relativamente pocas poblaciones M2 que están uniformemente dispersadas expresando CD206 (receptor de manosa) y CD301 (receptor de reconocimiento). Este estado es mantenido por secreciones de adipoquinas (IL-4 y adiponectina) producidas por eosinófilos y adipocitos, respectivamente. Los ATMs M2 mantienen la homeostasis del medio adiposo con secreciones de IL-10, la que a su vez sirve para regular la homeostasis de la glucosa en los tejidos sistémicos.

Los macrófagos M2 tienen distintas propiedades metabólicas, por ejemplo pueden sobre-regular la producción de ferroportin y des-regular la de ferritina H y hemo-oxigenasa. También favorecen la liberación de hierro que es importante para la proliferación celular. La expresión del receptor  $\square$  folato y la ingesta de folato

también son promovidas por el macrófago M2 (33). De tal manera que la presencia del receptor  $\square$  folato en M2 es utilizado como blanco terapéutico de drogas fusionadas a folato que buscan la eliminación de macrófagos asociados al tumor (TAM) en determinados tipos de cáncer (49).

Se ha demostrado que en las alergias (asma, polvo de casa, hongos, etc.), entidades en las que desde el punto de vista inmunológico es crítica la respuesta de tipo Th2 porque exagera la respuesta inmune en perjuicio del paciente, los linfocitos Th2 a través de IL-4 e IL-13 inducen una polarización de macrófagos M2, estos macrófagos a su vez secretan quimioquinas (CCL17, CCL22 y CCL24) que atraen no sólo linfocitos Th2 sino también Treg, eosinófilos y basófilos, lo que explica la exacerbación de la respuesta inmune en estos pacientes (Figura 2) (50).

Variaciones en el tema de la polarización M1/M2 también han sido encontradas in vivo como por ejemplo en la placenta y embrión (21); durante la infección por helmintos; enfermedades metabólicas, obesidad y cáncer. En pacientes con diabetes tipo 2 existe una importante reducción de los macrófagos M2 con una baja capacidad fagocítica; mientras que los M1 no varían pero tienen una alta capacidad migratoria. Además las complicaciones que se asocian a esta reducción de M2 son las nefropatías y retinopatías (47).

En el cáncer los fagocitos mononucleares son elementos clave de la inflamación relacionada al tumor y varios estudios han demostrado su participación en la tumorigénesis donde el número de macrófagos asociados al tumor (TAM) se correlaciona con pobre pronóstico en cáncer de mama, ovario y próstata (25). En las primeras etapas de un cáncer normalmente los monocitos reclutados se

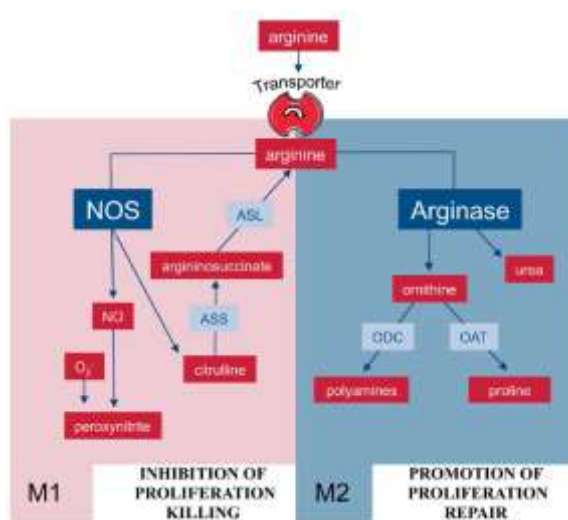
diferencian en macrófagos M1 y posteriormente en la transformación neoplásica, las señales provenientes del mismo tumor y de células estromales promueven el fenotipo M2 con lo cual hay una mayor probabilidad que el tumor progrese (25). Estudios demuestran que los macrófagos, las células supresoras de origen mieloide (MDSC) y TAM aislados de tumores humanos y de ratón tienen un fenotipo M2. Además se ha podido demostrar que monocitos humanos cultivados en presencia de LT reguladores ( $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ) se diferencian en macrófagos M2 caracterizados por una baja expresión de HLA-DR (MHC tipo II) y citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y CCL3) (33); sin embargo, el fenotipo pro tumoral M2 de los TAM observado en la mayoría de cánceres es reversible, por ejemplo, INF- $\gamma$  puede reeducar in vitro a los TAMs por lo tanto puede generar una actividad anti-tumoral en humanos (33).

Existen estudios que han demostrado que también es posible encontrar fenotipos de polarización de macrófagos mixtos (M1/M2) especialmente en tumores donde se sabe que ellos están expuestos a potencialmente varios factores polarizantes opuestos; sin embargo, no esta claro si tal polarización refleja la polarización mixta de células individuales o la coexistencia de macrófagos con distintos fenotipos (51).

La clasificación de los macrófagos en inmunofenotipos M1/M2 se puede dar en función del metabolismo de un aminoácido, la **Arginina**, teniéndose así macrófagos que la metabolizan a través de la óxido nítrico sintetasa (NOS) (**macrófagos M1**) a NO y citrulina o a través de la arginasa (**macrófagos M2**) a **Ornitina** y urea (30,46). La importancia de la **arginina** en el metabolismo de células inmunes involucra al cáncer, la inflamación, enfermedades fibróticas,



mecanismo que podría interferir con las funciones de los macrófagos M1 sobre la inhibición de la proliferación y eliminación de los patógenos (46). En los macrófagos M2 la arginasa dirige la vía alternativa del metabolismo de la arginina catalizando su hidrólisis a ornitina y urea; esta arginasa es inducida por PGE2 (Prostaglandina E2), citoquinas Th2 (IL-4 y IL-13) y AMPc. La ornitina es un sustrato para la ornitindescarboxilasa (ODC), una enzima importante en la síntesis de poliaminas que regulan procesos como la replicación de ADN, crecimiento celular y diferenciación (Fig.5). Asimismo, ornitina a través de ornitinaaminotransferasa (OAT) es un aminoácido precursor para la síntesis de prolina, la que a su vez es esencial para la síntesis de colágeno siendo importante en los procesos de remodelación del tejido.



**Figura 5. Metabolismo de la arginina y polarización M1/M2.**

**Ref. (46).** Los macrófagos M1/M2 se caracterizan por el metabolismo de la arginina vías NOS o arginasa con importantes consecuencias funcionales. Ver abreviaturas de la Fig. 4.

### Productos naturales y macrófagos

Existen muchos productos naturales cuya actividad bioquímica y biológica ha sido evaluada y los estudios demuestran que estas actividades podrían ser

responsables de sus propiedades antitumorales o antiinflamatorias como por ejemplo la actividad de oxido-reducción (redox), la citotoxicidad y la capacidad de inducir la activación y diferenciación de los macrófagos (52). Al respecto, los extractos acuosos de *Crinum latifolium* (una planta con flores) de la medicina tradicional vietnamita y china han demostrado una polarización M1 logrando la activación de este tipo de macrófagos para que supriman el crecimiento de líneas tumorales a través de un mecanismo conocido como tumorocitotoxicidad mediada por macrófagos (MTC) (52). El **Ginseng**, una de las plantas medicinales más famosa usada en todo el mundo y en particular el compuesto ginsenosido el Dammar - 24 (25) – ene - 3b, 12b, 20(S)- triol - (20 – O – b – D -glucopyranosyl)- 3 – O – b - D glucopiranosil- ( ½ ) – β – D -glucopiranosido (GSRd, C<sub>48</sub>H<sub>82</sub>O<sub>18</sub>·3H<sub>2</sub>O) ha demostrado tener propiedades antitumorales y antiinflamatorias. Asimismo, en el modelo animal de isquemia renal aguda, GSRd (50mg/kg) demostró protección al modular la polarización de macrófagos M1, reduciendo la infiltración celular y disminuyendo la producción de citoquinas inflamatorias (53). **Curcumina** es el principal ingrediente activo de la Cúrcuma, una planta nativa de la India. Los estudios in vitro con la línea celular de macrófagos RAW264.7 demuestran que la curcumina induce una polarización M2 a través de la sobre-regulación de la expresión de marcadores M2 como el receptor de manosa (MR), la arginasa 1 (Arg-1) y el receptor activado – proliferador del peroxisoma – tipo gamma (PPAR-γ). En este mismo estudio, curcumina incrementó la expresión del RNAm y proteínas de IL-4 y IL-13, citoquinas producidas típicamente por los macrófagos M2 (54). El ácido Oleanólico (OA) (ácido 3β-hidroxiolcano-12-en-28-oico) y su isómero el ácido

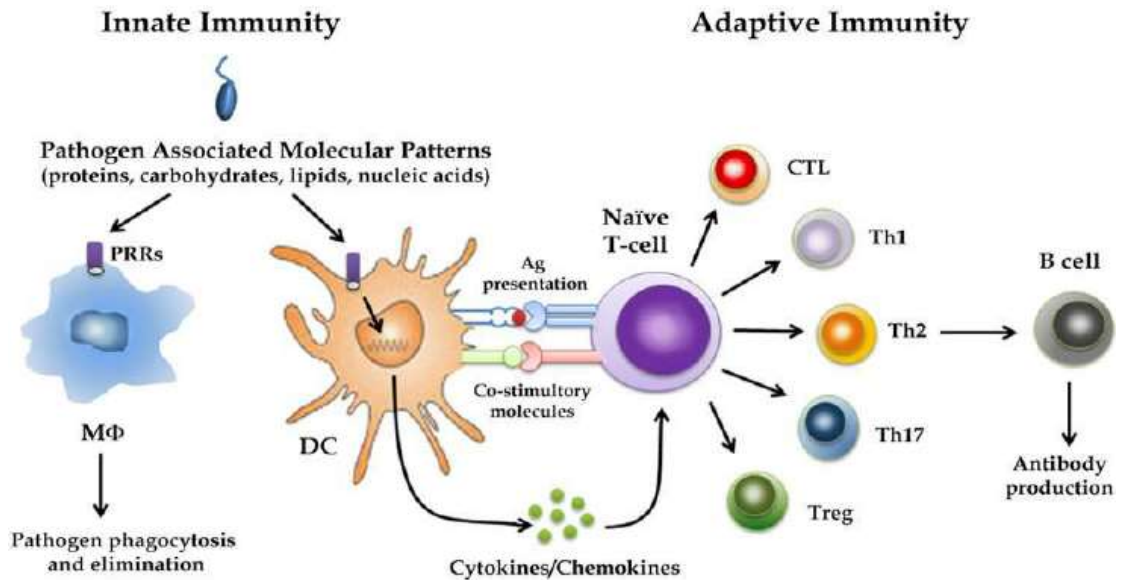
ursolico (UA)(ácido 3 $\beta$ -hidroxiuros-12-en-28-oic), son triterpenos encontrados en vegetales y plantas medicinales así como en aceitunas y la cascara de manzana entre otros. Los estudios de López-García S et al., demostraron que OA y UA mejoran la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), de TNF- $\alpha$ , óxido nítrico (NO) y CD36 induciendo un perfil M1 en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* mejorando la actividad antimicrobiana y la supresión de su crecimiento intracelular (55).

#### *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato) y monocitos-macrófagos

Los estudios antiguos y recientes ya demostraban que UT mejora la actividad fagocítica de los macrófagos (11,12). Allen-Hall L et al. 2007, utilizando una línea celular de monocitos (THP-1) estimulados con LPS, demostraron que un extracto hidroalcohólico de UT tenía acción moduladora sobre citoquinas proinflamatorias, disminuyendo en un caso la producción de TNF- $\alpha$  e incrementado la producción de IL-1 $\beta$ , en el otro caso (56). Aunque se trata de monocitos es posible que el estímulo con LPS y de UT estimulen su diferenciación a macrófagos por tanto no sería inusual que se induzca una polarización mixta M1/M2. Estos datos nos abrían la posibilidad que UT sería capaz de mejorar la inmunidad innata frente a infecciones en las que participa el sistema monocito-macrófago; sin embargo, hacia falta investigar que era lo que sucedía con los mecanismos que se desencadenaban previo a este proceso como la capacidad de reconocimiento de patógenos, las vías internas de señalización que conllevan a la activación de genes importantes para la defensa inmune y el desenlace de estos mecanismos que concluye con la eliminación de los patógenos.

## **Células dendríticas**

Las células dendríticas (DC) fueron descubiertas por Steiman RM y Cohn ZA en 1973 y deben su nombre a que pueden asumir una variedad de formas ramificadas y constantemente se extienden y retraen (57,58). Las DC son células que se derivan de la médula ósea y funcionan como células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales. Los progenitores de las DC se diseminan a través de la sangre hacia tejidos no linfoides donde se desarrollan a un estadio de DC inmaduras. Las DC inmaduras se caracterizan por una alta capacidad de captura y procesamiento de antígenos. Los mediadores inflamatorios promueven la maduración y migración de DC fuera de tejidos no linfoides hacia la sangre o la linfa. Estas células migratorias llegan a órganos linfoides secundarios donde se encuentran con linfocitos T (LT). En este estado (DC maduras), las DC han experimentado cambios dramáticos en sus propiedades: perdieron la capacidad de captura de antígenos y adquirieron una gran capacidad de estimular a los LT. Las DC maduras por tanto son capaces de presentar antígenos a los LT vírgenes iniciándose ahora una respuesta inmune adaptativa (58–62). Las DC también producen varias citoquinas y quimioquinas, tales como IL-12, IFN- $\gamma$ , CCL5 y CCL21, las que tienen una variedad de funciones inmunoregulatoras donde destaca la estimulación de los LT. Además, las DC son importantes en la regulación de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa y en el mantenimiento de la tolerancia central a LT (Fig.6) (63–65).

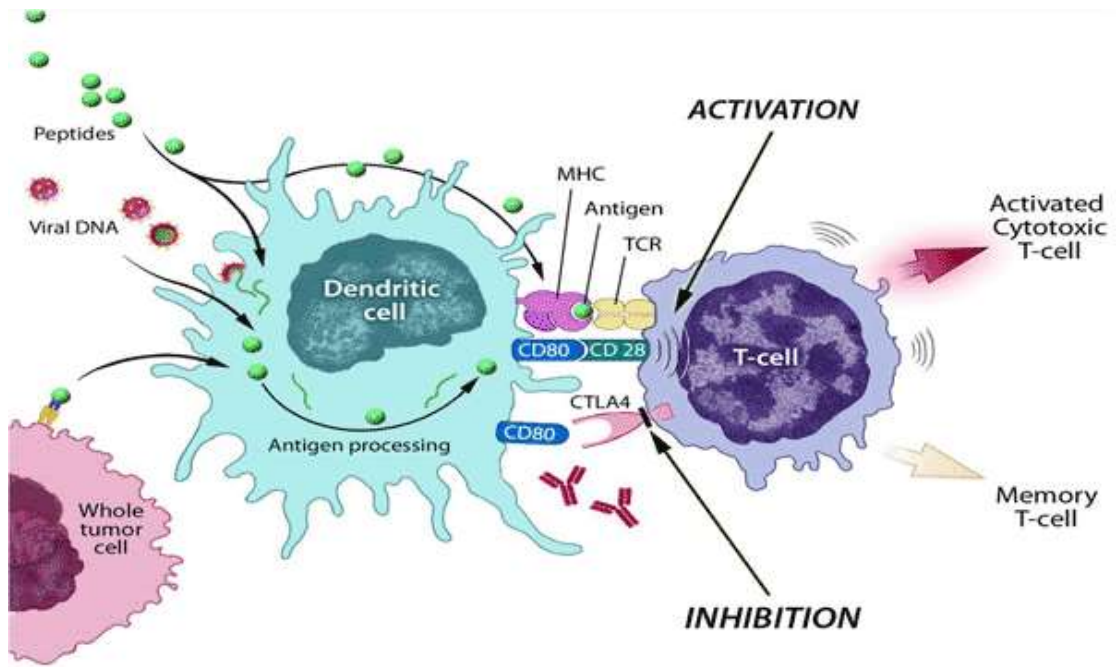


**Figura 6. Las DC enlazan la inmunidad innata con la adaptativa.**

**Ref.** (65). Luego del contacto con antígenos microbianos, las DC maduran y migran a ganglios regionales donde presentan estos antígenos a los LT vírgenes. Diferentes patógenos disparan distintos perfiles de maduración de las DC, conduciendo a la polarización de diferentes subpoblaciones de LT. La inmunidad adaptativa es por lo tanto modulada, para que coincida con la naturaleza del patógeno. Ag=Antígeno; CTL=LT citotóxico; DC= Célula dendrítica; LT=Linfocito T; M φ = Macrófago.

Dentro de la población de DC existen distintas subpoblaciones pero la clasificación más conocida es la de las DCm (mieloides, CD11c<sup>+</sup>) y las DCp (plasmacitoides, CD123<sup>+</sup>), en la que las DCm son más genéricas en su respuesta, mientras que las DCp se han encontrado mayormente identificadas con la respuesta antiviral a través de la producción de interferones tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (66,67). Las DC tienen un rol central en la inmunidad anti-tumoral debido a que procesan antígenos tumorales y estimulan a LT antígeno-específicos, lo que dependerá de una óptima señal coestimuladora entre ambas células (Fig.7) (68). Un potencial mecanismo del que los tumores escapan es la presentación de antígenos tumorales por las CPA entre ellas las DC. Estudios in vitro han demostrado que el sobrenadante de cultivo de líneas celulares cancerígenas que contenía VEGF (factor de crecimiento endotelio vascular) era capaz de inhibir la maduración de

las DC y que más bien incrementaba la proliferación de sus precursores CD34<sup>+</sup> (69,70). Estudios *in vivo* también han demostrado en pacientes con cáncer de mama que la subpoblación de DCm estaba marcadamente disminuida y además producían una reducida cantidad de IL-12, una citoquina necesaria para la polarización Th1; sin embargo, estas alteraciones fueron revertidas por la resección quirúrgica del tumor. En este caso el factor soluble liberado por el tumor que tuvo una correlación inversa con la cantidad de DCm fue espermina, la que mostraba niveles séricos elevados (70). Estudios *in vitro* utilizando el sobrenadante de cultivo de líneas celulares cancerígenas y enfrentándolo a DC aisladas a partir de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) también demostraron deficiencias en la maduración, pobre capacidad coestimuladora y de producción de IL-12 llevando a las DC a la muerte por apoptosis (71). De tal manera que con evidencias como las anteriores resulta interesante la estrategia de la generación de una vacuna celular de DC producida *in vitro* y reinoculada al mismo sujeto para evitar los mecanismos de escape inmune que muestran los tumores y que burlan la inmunovigilancia (72,73).



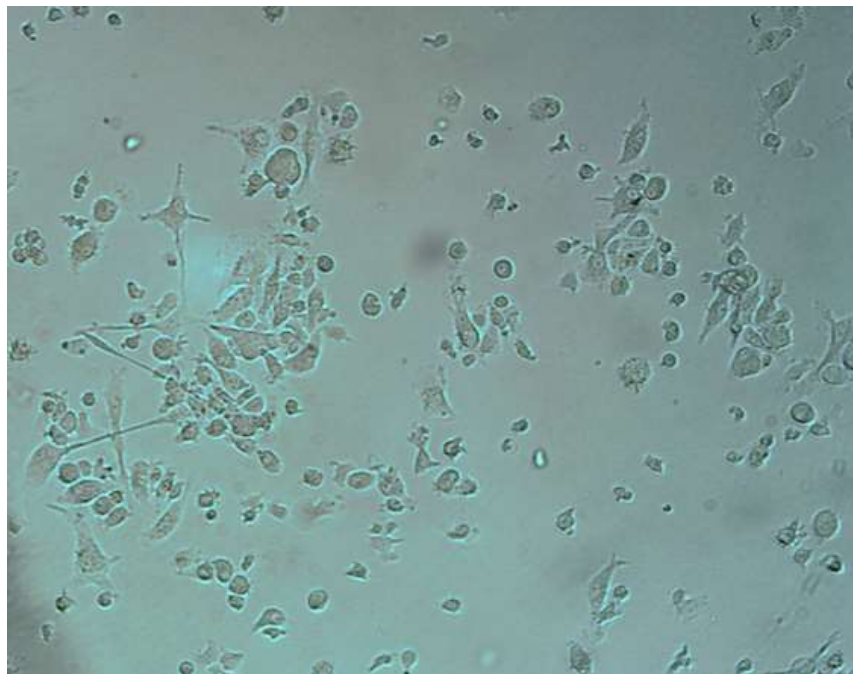
**Figura 7. Sinapsis inmunológica.**

Primera señal de presentación de antígenos entre MHC-II y TCR y segunda señal coestimuladora entre moléculas de la familia B7 (CD80,CD86) y sus respectivos ligandos activadores (CD28) en el LT. Tomado de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/first-treatment-vaccine-approved>

En relación a las vacunas de DC, se han diseñado varios ensayos clínicos para evaluar la seguridad y eficacia de estas vacunas y se estima que hay muchas otras en estudio (74,75) ; sin embargo, a la fecha la respuesta obtenida no ha sido muy satisfactoria. La única vacuna celular autóloga (Sipuleucel-T) que ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos muestra una supervivencia de 4,3 meses. Esta vacuna es elaborada a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con cáncer de próstata, las que fueron tratadas con una proteína recombinante de fusión humana (PAP-GM-CSF, Fosfatasa ácida prostática unida a factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) antes de la reinfusión. En este caso, se debe tener en cuenta que no solo están incluidas las DC como APC sino que también se

encuentran linfocitos B (LB), LT (CD4 y CD8) y Natural Killer (NK) por lo que se podría generar una respuesta antitumoral policlonal (76).

Particularmente, como parte de una revisión hecha sobre vacunas de DC en la inmunoterapia de melanoma (77) y la información generada en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la UPCH sobre *Uncaria tomentosa* y DC (78,79), propuse trabajar inicialmente con un modelo con el que se podrían obtener DC de ratón y luego "cargarlas" con antígenos tumorales obtenidos del melanoma murino C57/BL6 inducido con células B16. Con esta idea sólo se pudo llegar a obtener DC diferenciadas a partir de progenitores de médula ósea de ratón, las que se cultivaron en medio RPMI-1640 completo suplementado con GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos) (40ng/mL) durante 7 días (Fig. 8) (77).



**Figura 8. Diferenciación de células dendríticas.**

Ref. (77). Se aislaron células progenitoras ( $1 \times 10^6$  células/pozo) de la médula ósea de ratones C57/BL6, se cultivaron en medio RPMI-1640 completo suplementado con GM-CSF (40 ng/mL)

durante 7 días. Las DC diferenciadas muestran un citoplasma irregular a manera de prolongaciones ramificadas. GM-CSF (*Granulocyte-Monocyte Colonial Stimulate Factor*); DC (células dendríticas). Foto: microscopio de luz invertida, 40x, Laboratorio de Inmunología #108, UPCH.

Sin embargo, a pesar que no se pudo continuar con la generación de una vacuna celular, la revisión sobre el melanoma murino me llevo a aprender que los modelos como melanoma B16/BL6 en ratones BALB/c y C57BL/6 son aceptados para el estudio en cáncer por el entendimiento de su genética y porque reproducen características presentes en el humano, siendo este modelo uno de los más utilizados para la evaluación de drogas, inmunoterapias y productos naturales. Precisamente los estudios con productos naturales han demostrado que tienen reducidos efectos colaterales, baja citotoxicidad, buena capacidad de actuar sobre células blanco sin afectar a células normales y además son una alternativa terapéutica de bajo costo. Por ejemplo, Park W-B *et al.* evaluaron el efecto de las lectinas de *Viscum album* (muérdago) en ratones con melanoma, encontrando un efecto pro-apoptótico, anti-angiogénico, anti-metastásico e incrementador de la supervivencia (80). El polifenol epigalato (EG) derivado de *Camelia sinensis* (Té verde) posee actividad anti-metastásica. Asimismo, epigalocatequina 3 galato (EGCG) y Dacarbazina en ratones con melanoma redujeron la metástasis y el crecimiento tumoral (81). De igual forma la *Uncaria tomentosa* ha demostrado tener propiedades antitumorales que han sido evaluadas y cuyas evidencias se muestran a continuación.

#### ***Uncaria tomentosa* (Uña de Gato), cáncer y células dendríticas**

Dreifuss et al, utilizando el mismo extracto de *Uncaria tomentosa* (UT) que se evaluó en este estudio, demostró efectos anti-tumorales en ratas Walker-256 con carcinosarcoma donde UT no sólo redujo el volumen tumoral en el rango de dosis

de 10-100mg/kg sino también a través de su efecto antioxidante y regulador del sistema redox y del metabolismo de ROS en los que enzimas importantes como catalasa y superóxido dismutasa son inhibidas por el extracto lo que podría inducir la muerte de células malignas (19). También se ha demostrado la actividad antiproliferativa y anti-tumoral ante líneas celulares de cáncer de mama (MT-3) y sarcoma de Ewing (MHH-ES-a). En este caso el efecto del alcaloide oxindólico pentacíclico mitrafilina (obtenido de una planta peruana) se dio en el rango de 5 – 40uM. El alcaloide mitrafilina fue diferencialmente identificado a partir de su par estéreo isomérico isomitrafilina por resonancia magnética (<sup>15</sup>N-NMR) (82). Igualmente dos alcaloides (pteropodina y uncarina F), aislados por columna cromatográfica e identificados por HPLC, de un extracto acuoso de UT tuvieron el mayor efecto citostático sobre una línea celular de leucemia linfoblástica aguda de LT (LLA-T) (CEM-C7H2) inhibiendo la proliferación por más de un 95% luego de 48h de tratamiento con 100µmol/L, a esta misma dosis pteropodina incremento el nivel de apoptosis de 47% después de 24h de tratamiento a 68% y 81% después de 48h y 72h, respectivamente. Por tanto, se demostró que UT inhibió la proliferación de linfocitos T leucémicos a través de la inducción de apoptosis (83). Interesantemente, C-Med 100<sup>®</sup> un extracto patentado de UT (U.S. patent 6,039,949-CampaMed) con 8-10% de ésteres de alquil carboxilo (CAE) como ingredientes activos y prácticamente libre de alcaloides oxindólicos inhibió el crecimiento de tres líneas celulares tumorales humanas el rango de 0,25 – 1 mg/mL; sin embargo, no hubo incremento significativo del número absoluto de células muertas y tampoco inducción de apoptosis, es decir C-Med 100<sup>®</sup> inhibe el crecimiento pero no induce muerte celular. Este mismo extracto inhibió la

proliferación inducida por mitógenos de LT y LB de ratón sugiriéndose que el extracto puede interferir con algunos mecanismos que controlan la progresión del ciclo celular. Además se demostró que la proliferación inducida por IL-2 (un factor de proliferación de LT) era inhibida pero la producción de IL-2 no era afectada por el extracto C-Med 100<sup>®</sup> (84). Aunque existen pocos estudios en humanos se destacan, uno que demuestra una mejora en pacientes con tumores sólidos tratados con una dosis de 100mg del extracto seco de UT tres veces al día; sin embargo, este estudio se basa en el uso de cuestionarios para evaluar la calidad de vida, ansiedad, depresión y calidad de sueño, los que a pesar que demuestran cambios significativos se observa que la robustez de la evaluación estadística no es lo suficientemente sólida para considerar un efecto benéfico; mientras que los parámetros bioquímicos (proteína C reactiva, velocidad de sedimentación y  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida) e inmunológicos (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) no cambiaron significativamente (85). Otro estudio clínico randomizado demuestra una reducción de la neutropenia y restauración del daño del DNA relacionado a quimioterapia. En este estudio, 40 pacientes con carcinoma ductal invasivo estadio II quienes recibían un régimen de fluorouracilo, doxorubicina y ciclosfosfamida se dividieron en dos grupos uno de los cuales además recibió durante 21 días dosis de 3 tabletas de 300mg por día de un extracto etanólico de UT conteniendo 2,57% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos. Al final del sexto cíclico de quimioterapia las cuentas de leucocitos y neutrófilos fueron más significativas donde el grupo que recibió UT presento valores dos veces más altos de neutrófilos que el grupo sin UT, algo similar ocurrió con el número de monocitos a partir del tercer ciclo de quimioterapia (86).

Sobre el efecto en DC, aunque utilizando un triterpeno de *Uncaria rhynchophylla* el ácido uncarínico (URC) ya se había demostrado que era capaz de alterar el fenotipo y función de las DC, ya que el tratamiento con URC más IFN- $\gamma$  inducía una sobrerregulación de la expresión de moléculas coestimuladoras y marcadores de maduración (CD80, CD83 y HLA-DR) (87). Un estudio similar pero con el URC tipo C y tipo D obtenido de espinas de *Uncaria rhynchophylla* de origen Chino demostró que luego de diferenciar monocitos humanos a DC con factores de crecimiento estándar seguido de 2 días de tratamiento con URC C y D incrementaron de manera dosis-dependiente (0,01 - 1,0 $\mu$ M) la expresión de CD1a, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR pero además el co-cultivo con LT vírgenes logró diferenciarlos a Th1 productores de IFN- $\gamma$  y escasa cantidad de IL-4, lo que los lleva a concluir que URC C y D puede ser usado en el desarrollo de vacunas de DC para la inmunoterapia en cáncer (88). Asimismo, se ha reportado que una preparación comercial patentada de UT junto con un extracto del fruto de lentejas (*Lens esculenta*, Phytolens<sup>®</sup>) llamada POA- Phytolens<sup>®</sup> o BRC-306 demostró un efecto inmunomodulador sobre DC murinas al comportarse como un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa tipo 2 (Cox2), una enzima importante en inducir procesos inflamatorios y tuvo disminuyó la producción de IL-6 a la dosis de 25 $\mu$ g/mL otro mediador proinflamatorio; mientras que la producción de TNF y NO no fueron afectadas por este producto (89). Por nuestra parte hemos demostrado que el extracto de *U. tomentosa* con 5% de alcaloides oxindólicos proporcionado por CIFARMA SA (Lote 0008000345) disminuyó los porcentajes de DCm pero incrementó la expresión de HLA-DR y CD86 en sangre de pacientes con artritis reumatoide (79); mientras que en sujetos sanos este mismo

extracto también disminuyó el porcentaje de DCm pero no alteró la expresión de HLA-DR y CD86 sugiriéndose un efecto inmunomodulador sobre las DC (78). Los datos anteriores nos llevaron a hipotetizar que el extracto de UT podría tener algún efecto inmunomodulador e inmunoestimulante sobre las DC que se podría aprovechar en modelos animales de cáncer.

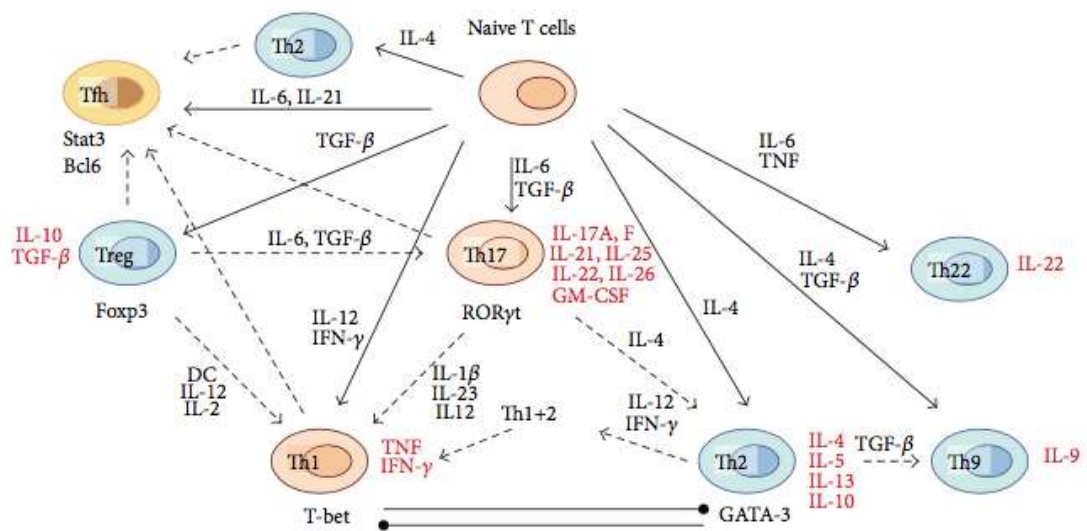
### **Linfocitos y citoquinas inmunomoduladoras**

Los linfocitos son grupo poblacional generado en médula ósea; sin embargo, a excepción de los linfocitos B (LB) y natural killer o asesinos naturales (NK), sólo los LT deben pasar por el timo para completar su desarrollo. Si bien es cierto los LT y LB son conocidos por su participación en la inmunidad adaptativa, los NK son además conocidos por su participación en la inmunidad innata, con lo cual existen más evidencias del trabajo cooperativo de ambos tipos de inmunidades; sin embargo, una de las poblaciones linfocitarias que ha demandado un alto interés en los investigadores por su rol de "director de orquesta" en el sistema inmune son los LT helper o ayudadores (Th). Los Th regulan la respuesta inmune celular citotóxica (LT CD8<sup>+</sup>) y la producción de anticuerpos por los LB; los Th interactúan con componentes del sistema inmune innato y responden a los estímulos de las CPA. Los Th CD4<sup>+</sup> vírgenes pueden ser activados y diferenciados hacia LT efectores y LT de memoria. Dependiendo de la intensidad del estímulo y la presencia de ciertas citoquinas y otros factores, los Th CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse a subpoblaciones de LT con funciones y propiedades específicas. Su especialización es regulada por un número de factores de transcripción que son activados en respuesta al estímulo y promueven la expresión

de distintos patrones de factores solubles y moléculas de superficie (90). Precisamente estos patrones son los que clasifican a las distintas subpoblaciones de LT, es decir existe una subclasificación funcional y no por marcadores de superficie. La primera clasificación fue la de Mossmann T y Coffman RL, quienes descubrieron la dicotomía Th1/Th2. Los Th1 inducen respuestas a patógenos intracelulares tales como virus, son quienes combatirían a células neoplásicas y se caracterizan por producir IFN- $\gamma$ . Además promueven la activación de macrófagos que son eficientes contra los patógenos intracelulares. Los Th2 están más involucrados en la respuesta inmune humoral y ayudan a los LB a cambiar la clase o isotipo de los anticuerpos (Por ej. de IgM a IgG) (91). En años recientes gracias a los estudios in vivo e in vitro se ha descubierto la subpoblación de linfocitos Th17 que responde a TGF- $\beta$  y producen la IL-17 principalmente. Aunque estas células participan importantemente en autoinmunidad en los últimos años se les ha estudiado en el cáncer donde se ha evidenciado que no sólo están en la circulación sanguínea sino que también estarían en el mismo tumor (microambiente tumoral, MT). Las evidencias se encuentran en pacientes con cáncer de ovario donde hay altas proporciones en el microambiente tumoral que en los ganglios linfáticos (92). El mecanismo por el que las Th17 promueven el tráfico y retención de LT efectores y NK en el MT se debería a que IL-17 induce la producción de quimioquinas por parte de células tumorales primarias, lo que a su vez permite la quimioatracción de células inmunocompetentes al MT, lo que indicaría el rol antitumoral de las células Th17 (92).

Otras subpoblaciones de LT son los reguladores (Treg); los Tfh (helper foliculares) que residen en los folículos y ayudan a los LB a producir anticuerpos.

Además, están los Th9 y Th22 que expresan IL-9 e IL-22, respectivamente, lo que demuestra la gran capacidad de diferenciación y plasticidad de los LT pero además de manera importante las citoquinas producidas por estas células y sobretodo en el MT pueden ser determinantes para el tipo de respuesta antitumoral (Fig.9) (90,93,94). Concretamente el desarrollo de tumores induce una reacción inmune dirigida por células del sistema innato (Células linfoides innatas, NKT, LT $\gamma\delta$ , NK, células dendríticas y macrófagos), mientras que LT citotóxicos y LT CD4+ productores de IFN- $\gamma$  (Th1) son reclutados hacia el tumor e inducen muerte celular, activan a los NK y a los macrófagos e inducen inflamación. Los Th1 y Th17 tienen un rol importante en la respuesta antitumoral al producir citoquinas Th1/Th17 y asistir en la eliminación de células tumorales (90,95).



**Figura 9. Vías de diferenciación y plasticidad de LT.**

Ref. (90). A partir de LT naive o vírgenes se muestra como a través del perfil de citoquinas que encuentran en su entorno estos LT se diferencian en distintas subpoblaciones de linfocitos Th. IL: interleuquina; DC: Células dendríticas; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; TGF- $\beta$ : factor transformante del crecimiento tipo beta; TNF: factor de necrosis tumoral; IFN- $\gamma$ : interferón gama.

### *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato), cáncer, linfocitos y citoquinas

Estudios previos en ratones Balb/c sanos tratados con un extracto hidroalcohólico (1:1) de UT con un contenido de alcaloides totales de 29,1mg/g ( $\pm 1\%$ ) colectado en Cruzeiro do Sul, Brasil, demostraron que en el rango de 125 a 1250mg/kg no existía toxicidad; que existía un incremento en el número relativo de linfocitos luego de 28 días de tratamiento; que se incremento el porcentaje de LT CD4+ activados y hubo una tendencia al incremento de LT inmaduros CD4+CD8+ (125mg/kg y 500mg/kg de UT) y que se incremento el porcentaje de LB vírgenes (CD45RA+) (1250mg/mL de UT); sin embargo hubo una disminución significativa de los LT CD8+ a 1250mg/kg de UT. En relación a la producción de citoquinas Th1/Th2, los resultados demostraron que los esplenocitos de estos ratones tratados con 100 y 500ug/mL de UT de manera dosis-dependiente disminuyeron los niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$  (citoquinas tipo Th1) e incrementaron los niveles de IL-4 e IL-5 (citoquinas tipo Th2), es decir en este caso el extracto de UT induce una polarización de tipo Th2 en los LT (96). Esta misma polarización Th2 fue demostrada con el mismo extracto pero en un modelo de diabetes murina inducida por estreptozotocina donde en el rango de dosis de 100 – 400 mg/kg se logro estabilizar los valores de LT CD4+ y CD8+, se incremento el número de Treg y se indujo una respuesta Th2 con niveles incrementados de IL-4 y IL-5 (97).

Por otro lado, es sabido que IL-12 cumple un rol central en el sistema inmune no sólo porque aumenta la actividad citotóxica de LT y NK y porque regula la producción de IFN- $\gamma$  sino también porque tiene la capacidad de promover el desarrollo de linfocitos Th1. Aunque con otra especie de *Uncaria*, la *U.*

*rhynchophylla*, Bae WK et al, demostraron que las DC maduras con el triterpeno, ácido uncarinico 0,1uM (URC) e IFN- $\gamma$  eran capaces de mejorar no sólo la producción de IL-12 sino también la proliferación de LT indicando que el URC induce una potente actividad presentadora de antígenos y direccionamiento hacia linfocitos Th1 productores de IFN- $\gamma$  (87).

Luego de analizar todas las evidencias sobre la capacidad inmunoestimulante e inmunomoduladora de UT se puede hipotetizar que sería un excelente candidato para combatir enfermedades infecciosas y cancerígenas debido a que los daños oxidativos e inflamatorios están estrechamente ligados en el proceso de carcinogénesis por tanto los compuestos con actividad antiinflamatoria pueden inhibir el estrés oxidativo y los que tienen actividad antioxidante pueden inhibir los procesos inflamatorios (14).

En nuestro caso la contribución al conocimiento básico de las propiedades inmunológicas de un producto natural de la medicina tradicional peruana podría ayudar a sentar las bases para estudios clínicos donde se puedan evaluar estas propiedades en condiciones reales tanto en sujetos sanos como con afecciones particulares como las infecciones o el cáncer. Además, de este estudio se rescata el estudio de las células inmunocompetentes sin estímulos que alteren su función biológica per se como por ejemplo el uso de agentes estimulantes como LPS utilizado por la mayoría de estudios, ya que en condiciones fisiológicas o patológicas como el cáncer, las células no se encontrarán con este tipo de estímulos. Una consecuencia de lo anterior sería la prevención o solución aquellas condiciones donde se vean implicados elementos del sistema inmune. Finalmente, el uso alternativo con tratamientos convencionales puede reducir los

costos de tratamiento en favor de los usuarios potenciales, por tanto se espera que este estudio contribuya a futuros estudios en el campo de la medicina convencional y alternativa.

## **2. HIPOTESIS**

El tratamiento con un extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa*, el cual contiene 5,03% de alcaloides oxindólicos totales (UT-TOA) producirá:

- Una baja actividad citotóxica, un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y una polarización M1 en macrófagos de humanos sanos.
- Un incremento de las poblaciones linfocitarias, células dendríticas y citoquinas inmunoestimuladoras a nivel sistémico y en el microambiente tumoral de ratones con melanoma.

### 3. OBJETIVOS

#### *Objetivos Generales*

- Determinar la inocuidad de UT-TOA en monocitos-macrófagos de humanos sanos.
- Determinar capacidad de inducción del estallido respiratorio y de polarización M1/M2 en monocitos-macrófagos de humanos sanos tratados con UT-TOA.
- Evaluar la respuesta de células inmunocompetentes y sus citoquinas en sangre periférica y/o en el microambiente tumoral de ratones con melanoma tratados con UT-TOA.

#### *Objetivos Específicos*

- Determinar el valor de IC50 para la viabilidad celular, la actividad de la lactato deshidrogenasa para la citotoxicidad y el nivel de apoptosis/viabilidad por citometría de flujo en **monocitos-macrófagos humanos** tratados con UT-TOA.
- Medir el estallido respiratorio o producción de ROS por quimioluminiscencia en **monocitos-macrófagos humanos** luego del tratamiento con UT-TOA.
- Medir la expresión relativa de RNA mensajeros y/o proteínas de citoquinas, quimioquinas y receptores relacionados con la polarización M1/M2 luego del tratamiento de **monocitos-macrófagos humanos** con UT-TOA.

- Medir los porcentajes de linfocitos T activados o no, natural killer, NKT, células dendríticas y citoquinas inmunoestimulantes en sangre periférica y/o en el microambiente tumoral de **ratones con melanoma** tratados con UT-TOA.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Sujetos de investigación humanos

Para los diferentes ensayos se obtuvieron muestras de 26 donantes voluntarios sanos de ambos sexos, con edad promedio de 30,6 años. Las muestras se han utilizado en grupos para distintos ensayos (Tabla 3). Las muestras de donantes franceses fueron obtenidas del Banco de Sangre del Centro Hospitalario Universitario (CHU), Hospital Rangueil, Toulouse, Francia. En el caso de los donantes peruanos, estos provinieron del Banco de Sangre del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins y se obtuvieron muestras de sangre pre-aféresis de los donantes voluntarios sanos para evaluar la seronegatividad a ciertas infecciones y los recuentos celulares como se sugiere en los valores referenciales de la tabla 2.

**Tabla 2. Descarte serológico de infecciones y recuentos celulares**

Infecciosas	Resultado normal	Recuentos celulares	Valores Absolutos Normales (miles/uL)
Hepatitis B	No reactivo o Negativo	Plaquetas	150-500
Hepatitis C		Leucocitos	4.5 - 10
HIV Ab + Ag		Neutrófilos	1,53 – 7,40
Sífilis		Linfocitos	0,94 – 4,80
Enfermedad de Chagas		Monocitos	0,09 – 0,8
HTLV		Eosinófilos	0,04 – 0,4
Core		Basófilos	0,01 – 0,1
Ácidos nucleicos HIV, Hepatitis B y C			

Referencia: <https://es.wikipedia.org/wiki/Leucocito>

Luego de conocer los resultados de la serología y el recuento celular de los donantes para la aféresis celular se les pidió un consentimiento informado, aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Ver Anexo 2) para donar sus **leucocitos** obtenidos como productos de desecho luego de una **aféresis sustitutiva** realizada como parte de la rutina para obtención de plaquetas en un Banco de Sangre. Los sujetos excluidos fueron aquellos que mostraron: enfermedades o infecciones agudas, inmunosupresión o transplante de órganos, enfermedades inflamatorias crónicas, cirugías recientes, trauma, eventos cardiovasculares y embarazo o lactancia.

**Tabla 3. Características de donantes voluntarios humanos**

Código	n	Procedencia	Ensayo
M1,M3,M4,1106, AGS,LVL,MJH	07	Perú	MTT
M4,1106,LVL,MJH, 1107, IRP	06	Perú	LDH
M2,1106,LVL,1107	04	Perú	Apoptosis
F1-F11	11	Francia	ROS
F12,F13	02	Francia	qRT-PCR
M2,AGS,ANS,DMA,MLG	05	Perú	Citometría
1106,1107,AGS	03	Perú	CBA

## 4.2. Sujetos de investigación animales

Ratones hembras o machos de la cepa C57BL/6 de 6 semanas de edad con pesos entre 20-25g fueron usados. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los animales fueron mantenidos a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y recibieron alimento balanceado y agua ad libitum. La ejecución del proyecto fue aprobada por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales CIEA de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con el código de inscripción 56290 y 62867. En todos los casos el vehículo diluyente y las distintas dosis del extracto de UT-TOA fueron administradas por sonda gástrica. En todos los casos cada grupo contaba con 10 animales; sin embargo, por cuestiones de manipulación y por la misma inducción del tumor algunos ratones murieron antes de tiempo y no fueron incluidos. En el caso de las muestras de sangre sólo se pudo obtener cantidad suficiente para el CN por lo que se tuvo que hacer pools para los otros grupos debido a la escasa cantidad de sangre, mientras que en el caso de los tumores se usó el tumor de cada animal (Ver Tabla 04). Todos los experimentos con animales fueron desarrollados de acuerdo a Principles of Laboratory Animal Care (Publicación NIH 85-23, revisado en 1985).

**Tabla 4. Grupos de estudio según diseño experimental**

Sangre periférica (PBMC)	CN (n)	M-S (n)	UT-TOA50 (n)	UT-TOA500 (n)	UT-TOA1000 (n)
LT CD4/CD8/CD44	02	03	02	02	03
Citoquinas (Th1/Th2)	03	03	02	03	03
Microambiente (MTMC)	---	M-T (n)	UT-TOA100	UT-TOA500	UT-TOA1000
LT CD4/CD8/CD69	---	04	03	05	05

LT(CD3+); NK; NKT	---	02	02	04	03
DCm/DCp	---	06	09	07	05
Citoquinas (Th1/Th2/Th17 e Inflamatorias)	---	06	08	07	05

CN= Control sin melanoma; **M-S**= Control con melanoma y sin UT-TOA para sangre (3 pooles por cada 3 animales); **UT-TOA**= Con melanoma más dosis de 50 – 1000 mg/kg; Para **50 y 500mg/kg**= 2 pooles por cada 3 animales; Para **1000mg/kg**=3 pooles por cada 3 animales; **M-T**= Control con melanoma y sin UT-TOA para tumor individuales por ratón. LT= Linfocito T; PBMC= Células mononucleares de sangre serífica; **MTMC**= Células mononucleares del microambiente tumoral; **NK**= Linfocitos natural killer; **NKT**= Linfocitos NKT; **DCm** y **DCp**= Células dendríticas mieloides y plasmacitoides.

### 4.3.Preparación del extracto de UT-TOA para ensayos in vitro

El extracto de UT-TOA, obtenido de la decocción de la corteza de *Uncaria tomentosa* fue donado por la empresa Peruvian Heritage SAC consistió de un polvo marrón-rojizo obtenido por atomización luego de la extracción con etanol-agua (70:30). El contenido de alcaloides oxindólicos totales inicialmente reportado en el año 2012 fue equivalente a 5,03% y fue determinado por Peruvian Heritage SAC siguiendo la metodología de HPLC (cromatografía líquida de alta performance) según lo reportado por Laus G et al y Dreiffus AA et al, quien además preparo una fracción clorofórmica siguiendo la metodología de Ganzera M et al (1,18–20). Brevemente, Laus G et al obtuvieron la corteza de la raíz molida de la variedad amarillo-marrón de una planta obtenida de la Provincia de Chanchamayo, Junín-Pasco, Perú, la cual fue extraída con dióxido de carbono supercrítico y luego el extracto graso fue tratado en un sistema ácido-base. La separación de los alcaloides se realizó en acetonitrilo-buffer fosfato acuoso (pH 7,0) (45:55) a una velocidad de flujo de 1,3mL/min. La temperatura de la columna fue de 80°C y la detección se hizo a 245nm. La acumulación de presión típica fue de 55bar. Los cromatogramas fueron desarrollados con etil acetato-hexano (9:1) y los "spots" fueron detectados

con luz UV a 254nm. Se utilizaron soluciones estándar stock de pteropodina (pureza > 98%), isopteropodina (70%) y especiofilina (40%). De estas mezclas enriquecidas se obtuvieron los isómeros puros para ser usados como estándares. Para la preparación de las muestras, la corteza de la raíz (1000g) se molió finamente y se filtro con 20mL de metanol-agua-ácido clorhídrico 1,2M (50:50:1) por 1h a 20°C y el extracto fue decantado y filtrado, este procedimiento se repitió 4 veces y los extractos combinados fueron diluidos a un volumen final de 100mL. Se tomaron alícuotas diluidas 1/5 en buffer fosfato acuoso, se filtraron y se desgasificaron antes de la inyección en el HPLC. Mediante esta metodología se logró identificar la presencia de los alcaloides: Pteropodina, Isopteropodina, Especiofilina, Uncarina F, Mitrafilina e Isomitrafilina (18).

En el presente estudio, para su uso en los ensayos experimentales se pesaron 50mg del polvo fino del extracto hidroalcohólico donado por Peruvian Heritage SAC y se disolvieron en 1mL de DMSO (dimetilsulfóxido) luego se completo con medio SFM hasta 10mL obteniendo una concentración stock de 5mg/mL similar a lo realizado por Bors M et al con algunas modificaciones (98); se realizó la esterilización con filtros de 0,22um y la solución obtenida fue alicuotada (50 y 100ul) y almacenada a -70 °C hasta su uso.

#### **4.4. Preparación del extracto de UT-TOA para los ensayos in vivo**

Se utilizo el mismo extracto indicado en 4.3 con la diferencia que la solución stock de UT-TOA se preparo pesando 30 g del polvo, el que se

agregó a un matraz de 5L estéril y se diluyó en un 1L de agua bi-destilada estéril, dejando hervir la mezcla por 30 minutos para luego dejar reposar. 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 a partir de las que se prepararon las dosis a evaluar y todas se guardaron a -20°C hasta su uso.

#### **4.5. Obtención de monocitos-macrófagos humanos adherentes**

A partir del producto leucocitario obtenido de los donantes voluntarios, los leucocitos se mezclaron en partes iguales con PBS pH7,2 estéril; esta mezcla se agregó en un tubo conteniendo histopaque 1,077mg/mL a la relación 1:2 (histopaque:leucocitos) y se centrifugó a 1800rpm durante 30 minutos al cabo de los cuales se observó una gradiente de centrifugación. De esta gradiente se obtuvo el anillo celular o "buffy coat" correspondiente a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), las que se transfirieron a otro recipiente y se lavaron dos veces por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos para remover los restos de reactivo y otros componentes de la sangre.

Las PBMC se resuspendieron en medio Macrophage-SFM (5%SFB, 1%Penicilina/Estreptomicina), Gibco y se contaron en una cámara de Neubauer para determinar la cantidad de células y su viabilidad (en todos los casos fue >90%).

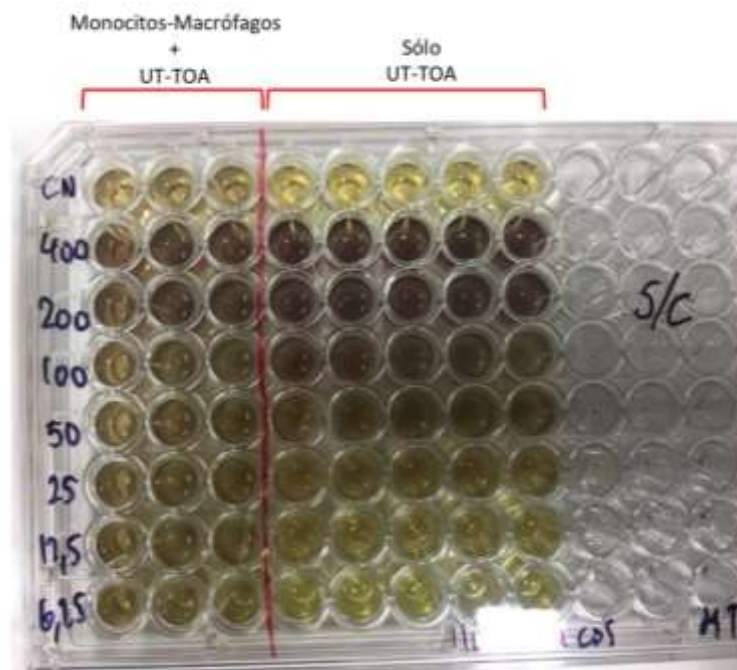
Mediante este procedimiento se obtuvo una gran cantidad de leucocitos ( $>400 \times 10^6$  células) por lo que se procedió a su almacenamiento por criopreservación en nitrógeno líquido y para los siguientes usos se hizo el descongelamiento por lotes.

Para cada ensayo se sembraron entre  $1,5 - 2,0 \times 10^6$  leucocitos/pozo en una placa de microtitulación y se incubaron durante 1h30min a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad. Luego de la incubación se lavaron los pozos 2 veces con sales de Haanks (HBSS+) para remover todas las células no adherentes; mientras que las células adherentes correspondieron a los monocitos-macrófagos (esta fracción corresponde aproximadamente al 10% del total de leucocitos sembrados por pozo).

#### **4.6. Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT**

Se utilizó una técnica colorimétrica que evalúa la actividad metabólica celular. La actividad de las enzimas oxido reductasas celulares dependientes de NAD(P)H pueden reflejar el número de células viables presentes. Estas enzimas reducen el colorante tetrazolium o MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium) a una sustancia insoluble denominada formazan que produce un cambio en la coloración del medio de cultivo en el que estaban creciendo los monocitos-macrófagos humanos a una tonalidad violácea; mientras que en el caso de los monocitos-macrófagos humanos no viables estos no degradarán el colorante y no colorearán el medio de cultivo. Bajo estas condiciones fue posible medir por espectrofotometría la intensidad de color del medio en el

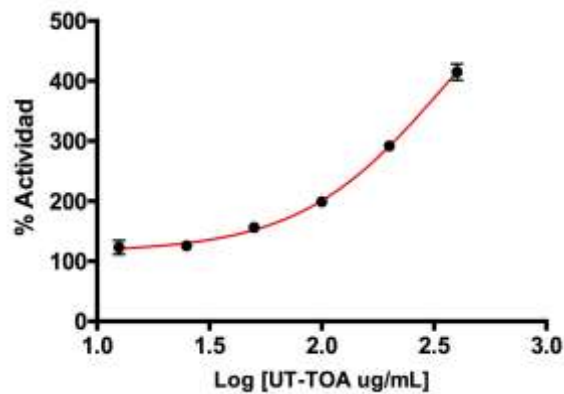
que se encontraban las células y determinar la viabilidad de las mismas, lo que nos llevó, utilizando las lecturas de absorbancia a determinar el valor de la concentración inhibitoria que causa la muerte del 50% de las células (IC50); sin embargo, el extracto UT-TOA presenta una fuerte coloración rojo-vino debido al contenido de sus distintos metabolitos y a pesar de que se usan distintas concentraciones diluidas estas muestran aún una coloración oscura (sobre todo a concentraciones altas), la que se intensifica con la coloración violácea del MTT. Es decir, en esta técnica en particular hay un "efecto colorimétrico", observado a las concentraciones más altas, al momento de realizar las lecturas espectrofotométricas (Figura 10).



**Figura 10. Efecto colorimétrico de UT-TOA.**

Se sembraron por triplicado monocitos-macrófagos ( $0,15 \times 10^6$ ) tratados o no con UT-TOA (6,25 – 400ug/mL) y por quintuplicado recipientes sin células y que sólo recibieron –UT-TOA (6,25 – 400ug/mL), luego se incubó la placa por 24h, 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para realizar el ensayo de MTT. Se muestra la placa antes de realizar la lectura en el espectrofotómetro. UT-TOA= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales; CN = Control negativo sin tratamiento.

Inicialmente este "efecto colorimétrico" generaba un falso incremento de la viabilidad celular de manera dosis-dependiente, es decir a concentraciones altas había mayor intensidad de la coloración lo que se traducía en una mayor viabilidad que no era consistente con otros ensayos como la medición de la actividad de la LDH o el ensayo de apoptosis (Figura 11).



**Figura 11. Determinación de IC50 de UT-TOA por el ensayo de MTT con efecto colorimétrico.**

Gráfica representativa del promedio de 07 muestras cada una por triplicado de monocitos-macrófagos adherentes ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) tratados con UT-TOA (6,25 – 400ug/mL) durante 24h. La formación de cristales de formazan disueltos en isopropanol-HCl generó una coloración violácea que fue medida a 578nm. La gráfica representa una regresión no lineal sigmoideal de tipo dosis-respuesta donde: **% Actividad**= Actividad sobre la viabilidad celular de la muestra comparada a la viabilidad del control negativo (CN) cuya absorbancia representa el 100%; **Log (UT-TOAug/mL)** = Logaritmo de base 10 de las concentraciones de UT-TOA (6,25 – 400ug/mL); **IC50** = Antilogaritmo de Log de la concentración que produce el 50% del incremento de la viabilidad celular. Cada punto representa el promedio  $\pm$  error estándar de la media. **UT-TOA** = Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales.

Por lo tanto, para corregir este efecto se procedió a correr paralelamente a las muestras de monocitos-macrófagos tratados con las distintas concentraciones de UT-TOA, recipientes conteniendo las mismas concentraciones de UT-TOA pero sin muestras celulares. Finalmente, las absorbancias de los recipientes que recibieron solo UT-TOA fueron

restadas a las absorbancias de los recipientes que tenían células y además UT-TOA (Fig. 10).

### **Procedimiento del ensayo de MTT**

- Se cultivaron por triplicado, en una placa fondo plano transparente de 96 pozos, muestras de 07 donantes ( $0,15 - 0,20 \times 10^6$  monocitos-macrófagos/pozo) obtenidos según el procedimiento 4.5 en un volumen de 180uL de medio Macrophage-SFM y se trataron con 20uL del extracto de UT-TOA en un rango de concentraciones finales entre 6,25 – 400ug/mL durante 24h. Los controles negativos (CN) celulares no recibieron el extracto de UT-TOA y sólo se les agregó 200uL del medio Macrophage-SFM, GIBCO. Nota: Adicionalmente, se usaron por quintuplicado pozos sin células (180uL de medio Macrophage-SFM), los que recibieron 20uL del extracto de UT-TOA (6,25- 400ug/mL). Los controles negativos (CN) de este grupo no tenían células ni recibieron el extracto de UT-TOA y sólo se les agregó 200uL del medio Macrophage-SFM, GIBCO.
- Se preparó una solución estéril de MTT (5mg/mL) en buffer PBS pH 7,2.
- Se agregó a cada pozo 15uL de MTT.
- Se incubó la placa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 3-4 horas.
- Se agregó 100uL de Isopropanol-HCl 0,04N por pozo.
- Se solubilizaron los cristales de formazan por pipeteo.
- Se midió la absorbancia a 578nm en un lector de ELISA LisaScan EM, Erba. **Cálculo de resultados**
- Se restó el promedio de absorbancias del quintuplicado del CN del grupo sin células y sin UT-TOA a los valores de absorbancia promedio de cada

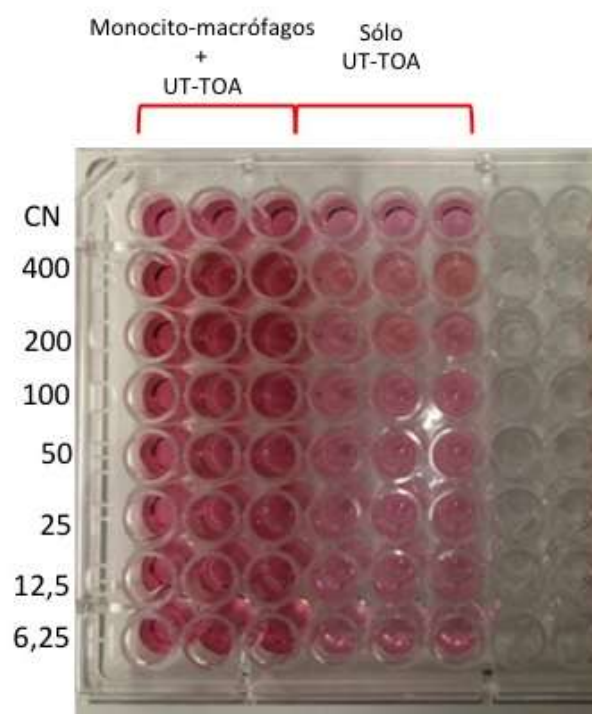
concentración de UT-TOA utilizada obteniéndose sólo la absorbancia de UT-TOA (absorbancia corregida). Finalmente, se restó la absorbancia promedio corregida de cada concentración de UT-TOA a los triplicados de las respectivas absorbancias de las muestras celulares tratadas con cada concentración de UT-TOA.

- Para obtener el valor de IC50 las absorbancias de los triplicados fueron transformadas en porcentajes de actividad, tomando la absorbancia del control negativo (CN) como la actividad de 100% y por regla de tres simple se calcularon los porcentajes de actividad de las muestras a partir de sus absorbancias.
- Las concentraciones se transformaron a unidades logarítmicas de base diez.
- Para obtener el valor de IC50 se realizó una regresión no lineal con una curva de fijación de dosis-respuesta sigmoideal en el programa GraphPad Prism version 5.00 para Mac, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). El valor de IC50 equivale al antilogaritmo del LogIC50 calculado por el software y se expresa en unidades de ug/mL.

#### **4.7. Evaluación de la citotoxicidad mediante la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)**

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática estable presente en todas las células. Es rápidamente liberada al sobrenadante de cultivo celular cuando la membrana plasmática está dañada. Por lo tanto, su presencia es una estimación del estatus fisiológico de las células y un

buen marcador de daño celular (99). Se utilizó el kit Cytotoxicity Detection kit<sup>PLUS</sup> (LDH), Roche Applied Sciences, Germany para realizar el ensayo enzimático. En el primer paso  $\text{NAD}^+$  se redujo a  $\text{NADH}/\text{H}^+$  por la conversión catalizada por LDH de lactato a piruvato. En un segundo paso un catalizador (diaforasa) transfirió  $\text{H}/\text{H}^+$  de  $\text{NADH}/\text{H}^+$  a la sal de tetrazolium INT, la cual se redujo a formazan. Este es un ensayo colorímetro en el cual la intensidad de color de la reacción fue directamente proporcional a la actividad de la LDH y por tanto a mayor actividad mayor muerte celular y a la inversa. A diferencia del ensayo de MTT en este ensayo no se observó un "efecto colorimétrico" probablemente porque la acción catalizadora de la "mezcla de reacción" usada en el ensayo neutralizó la coloración natural de UT-TOA, no siendo necesario restar las absorbancias de los pozos que tenían sólo UT-TOA a los recipientes que contenían células y UT-TOA (Figura 12); sin embargo, si se restó a los recipientes de ensayo la absorbancia del grupo control negativo (CN) sin células y sin UT-TOA (control de ruido o background) para corregir el efecto del medio de cultivo.



**Figura 12. Ausencia de efecto colorimétrico de UT-TOA.**

Se sembraron por triplicado monocitos-macrófagos ( $0,15 \times 10^6$ ) tratados o no con UT-TOA (6,25 – 400ug/mL) y por triplicado recipientes sin células y que sólo recibieron o no UT-TOA (6,25 – 400ug/mL), luego se incubó la placa por 24h, 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para realizar el ensayo de LDH. Se muestra la placa antes de realizar la lectura en el espectrofotómetro. **UT-TOA**= extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales; **CN** = control negativo con o sin células y sin tratamiento; **LDH**= lactato deshidrogenasa.

### **Procedimiento del ensayo de LDH**

- Se cultivaron por triplicado, en una placa fondo plano transparente de 96 pozos, muestras de 06 donantes distintos ( $0,15 - 0,20 \times 10^6$  monocitos-macrófagos/pozo) obtenidos según el procedimiento 4.5 en un volumen de 180uL de medio Macrophage-SFM y se trataron con 20uL del extracto de UT-TOA en un rango de concentraciones finales entre 6,25 – 400ug/mL durante 24. Los controles negativos (CN) no recibieron ningún extracto de UT-TOA y sólo se les agregó 200uL del medio Macrophage-SFM, GIBCO.

- Luego de la incubación se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se ensayaron de inmediato o se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior ensayo.
- En una placa fondo plano transparente de 96 pozos se agregaron por triplicado controles negativos sólo con 80uL de medio de cultivo y además 80uL de cada uno de los sobrenadantes de las muestras de UT-TOA a evaluar.
- Se agregaron 80uL a cada pozo del reactivo "Mezcla de Reacción". Nota: se preparo haciendo una dilución 1/45 del catalizador con la solución colorante.
- La placa se incubó durante 30 minutos a  $15^{\circ}\text{-}20^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad.
- Se midió la absorbancia a 492nm en un lector de microplacas LisaScan EM, Erba.

#### **Cálculo de resultados**

- Se resto las absorbancias de los controles de ruido (CB) a los valores de absorbancia de cada CN y concentración de UT-TOA.
- Se realizaron gráficas de la actividad de LDH a 492nm versus el CN y las concentraciones finales de UT-TOA (6,25 – 400ug/mL).
- Los resultados se interpretaron en base a la actividad de la LDH, es decir, a mayor incremento de la producción de Formazan (mayor absorbancia) mayor efecto citotóxico.
- Para considerar un incremento de la actividad de la LDH, este debió ser estadísticamente significativo comparado con el CN.

#### **4.8. Medición de apoptosis con tinción con el colorante 7-aminoactinomicina D (7-AAD) por citometría de flujo**

El 7-AAD es un colorante fluorescente derivado de la actinomicina D que selectivamente se une a regiones de GC en el DNA. Frecuentemente se usa para colorear y excluir células muertas por citometría de flujo. También permite distinguir entre células viables y apoptóticas o muertas a partir de su penetración o no por la membrana celular, por tanto la intensidad de fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la apoptosis celular; mientras que en células viables no hay emisión de fluorescencia. El 7-AAD ha demostrado ser comparable a Anexina V desde la fase de apoptosis temprana e incluso puede reemplazar al yoduro de propidio (100).

##### **Procedimiento del ensayo de 7-AAD**

- Se cultivaron por triplicado, en una placa fondo plano transparente de 24 pozos, monocitos-macrófagos de 04 donantes ( $0,15 - 0,20 \times 10^6$  monocitos-macrófagos/pozo) obtenidos según el procedimiento 4.5 en un volumen de 540uL de medio Macrophage-SFM y se trataron con 60uL de distintas concentraciones del extracto de UT-TOA durante 24 y 48h. Los controles negativos no recibieron ningún extracto y sólo se les agregó 600uL del medio Macrophage-SFM, GIBCO. **Nota:** Se evaluó un rango de concentraciones finales comprendido entre 6,25 a 400ug/mL a partir de una solución stock del extracto UT-TOA de 5mg/mL.
- Luego de la incubación se lavó la placa 2 veces con sales de Hanks (HBSS+).

- Se agregó a cada pozo 1mL de PBS pH 7,2 frío (PBS-/-).
- Se colocó la placa sobre un recipiente con hielo y se procedió a resuspender el PBS-/- durante 30-60s con la ayuda de una micropipeta.
- Con una paleta tipo "cell scraper" se procedió a raspar la superficie del pozo para remover los monocitos-macrófagos adherentes.
- Las células resuspendidas en el PBS-/- fueron trasvasadas a tubos de citometría conteniendo 1mL de PBS-/- frío.
- Los tubos fueron centrifugados a 1500rpm durante 5 minutos.
- Se descartó el sobrenadante.
- El sedimento celular fue resuspendido en 100uL de 7-AAD diluido en PBS con 1% Suero Fetal Bovino (PBS 1% SFB). **Nota:** Para cada tubo de citometría se usaron 5uL de 7-AAD y 95uL de PBS 1% SFB (dilución 1/20 del stock).
- Los tubos se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
- Se realizó la adquisición de 15000 eventos en el canal FL3 de un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences).
- Los resultados se interpretaron en base a la incorporación o no del colorante, siendo las células viables 7-AAD negativas y las células apoptóticas 7-AAD positivas para la emisión de fluorescencia.
- La data fue almacenada en archivos FSC y analizada en el software FlowJo vX.0.7.

#### **4.9. Medición de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)**

El estrés oxidativo representa un imbalance entre la producción de ROS/RNS (especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno) y la capacidad del sistema biológico de detoxificar los intermediarios reactivos o de reparar el daño resultante. En condiciones normales ROS esta reducido a agua. Por esta razón las células están protegidas contra el estrés oxidativo por una cadena interactuante de enzimas antioxidantes. Disturbios en el estado redox normal de los tejidos puede causar efectos tóxicos sobre la célula que la pueden conducir a la muerte celular (101). ROS es considerado perjudicial para la célula; sin embargo, también tiene roles importantes en la regulación de vías de señalización y expresión de genes, en la diferenciación de monocitos a macrófagos, así como también en la eliminación de microorganismos invasivos capturados por el macrófago, a través de superóxido ( $O^{2-}$ ) por ejemplo (102).

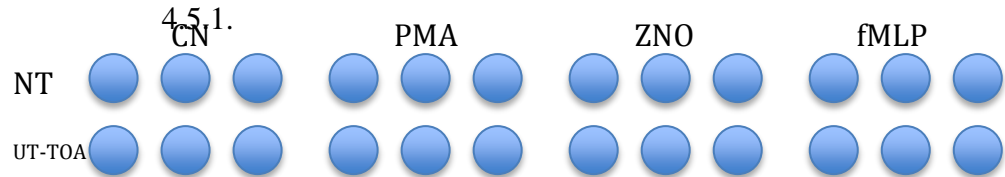
Los agentes estimulantes que se usan comúnmente son **PMA** (forbol miristato), que activa la vía de la PKC e induce la producción endógena de superóxidos (ROS); **ZNO** (zymosan), obtenido de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, que activa a los macrófagos vía TLR2 y Dectina-1 y **fMLP**, un péptido quimiotáctico que induce el estallido metabólico, aumento de la velocidad respiratoria, secreción de enzimas lisosomales y producción del anión superóxido (103).

### **Procedimiento del ensayo de ROS**

- Se cultivaron por triplicado, en una placa fondo plano de color blanco de 96 pozos, 11 muestras de monocitos-macrófagos humanos (0,15 – 0,20 x 10<sup>6</sup> monocitos-macrófagos/pozo) obtenidos según el procedimiento 4.5 en un volumen de 180uL de medio Macrophage - SFM y se trataron con 20uL del extracto de UT-TOA en un rango de concentraciones finales entre 0,01 – 25ug/mL durante 2h de tratamiento y adicionalmente 24, 48 y 72h de cultivo y en otro ensayo independiente se evaluó el rango de 6,25 – 150ug/mL durante 24 y 48h de cultivo, al cabo de los cuales se midió la producción de ROS. En todos los casos los controles negativos (CN) no recibieron UT-TOA, ni estímulo (PMA o ZNO o fMLP) alguno sólo 200uL del medio Macrophage-SFM, GIBCO. **Nota:** Los rangos indicados se utilizaron con el objetivo de encontrar la(s) concentración(es) que incremente(n) la producción de ROS, para de esta manera proseguir con el resto de ensayos en los que no era posible evaluar rangos amplios de concentraciones debido a la demanda de material.
- Se aspiró y lavó el contenido de cada pozo 2 veces con sales de Hanks (HBSS+).
- Se agregó 150uL de HBSS+ a los controles negativos (CN), sin tratamiento (NT) y con UT-TOA y 120uL de HBSS+ al resto de pozos.
- Se agregó 30uL de luminol (60µM) a todos los pozos.
- Se agregó 30uL de PMA (100nM) o ZNO(50ng/mL) o fMLP(1uM) (controles positivos de producción de ROS), respectivamente, excepto a

los controles negativos (CN). La lectura es inmediata y los controles positivos son los estímulos.

○ **Esquema del ensayo de ROS:**



- Se hizo la lectura de la emisión de quimioluminiscencia durante 1h 30min en un equipo de quimioluminiscencia EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer, France) y se obtuvieron valores de unidades de quimioluminiscencia por cada minuto.

La data se analizó en Excell y GraphPad Prism versión 7.0 for Mac y representa la media de las lecturas de quimioluminiscencia durante 1h30min versus los distintos grupos de evaluación. Los resultados de la producción de ROS fueron previamente normalizados debido al "efecto colorimétrico" del extracto de UT-TOA para lo cual se representó gráficamente la relación entre las lecturas de quimioluminiscencia de las células que fueron tratadas o no con UT-TOA y recibieron o no estímulos y las lecturas de quimioluminiscencia de células tratadas o no con UT-TOA pero que no recibieron estímulo (NS).

**Cultivo de *Candida albicans* para ensayos de ROS:**

- Se contaron con cepas de laboratorio de *C. albicans* almacenadas a -20°C .  
Nota: La cepa de *C. albicans* fue donada amablemente por la Dra. Agnès Coste, Director del Laboratorio de Macrófagos y Receptores Nucleares en

Inflamación e Infección de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Paul Sabatier, Toulouse, Francia.

- Luego de descongelar las cepas se agregó 200uL de la suspensión gota a gota sobre placas Petri conteniendo agar Sabouroud y con la ayuda de unas perlas de vidrio se sembró por toda la superficie de la placa.
- Las placas se cultivaron a 37°C durante 24h y 48h.
- Se recupero una alícuota del cultivo de las levaduras y se agrego a 1mL de HBSS+
- Se hizo una dilución 1/100 en HBSS+ y se cargo 10uL a una cámara de Neubauer para el conteo.
- Se realizaron los cálculos para obtener una proporción de monocitos-macrófagos:*C. albicans* de 1:3, por ejemplo  $0,15 \times 10^6$  a  $0,45 \times 10^6$ . Todo por triplicado como se indica en 4.9 y en el esquema del ensayo de ROS.
- Finalmente se siguieron exactamente los pasos del procedimiento 4.9 a diferencia que en lugar de los estímulos (PMA, ZNO o fMLP) se utilizó *C. albicans*
- Los monocitos-macrófagos ( $0,15 - 0,2 \times 10^6$ ) de 02 donantes fueron tratados previamente con la concentración final de 25ug/mL de UT-TOA durante 24h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 98% de humedad.

#### **4.10. qRT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa)**

Mediante esta técnica se evaluó la expresión relativa del RNA mensajero (RNAm) de genes de moléculas que determinan la polarización

transcripcional de monocitos-macrófagos tratados con **UT-TOA** con respecto al RNAm de un gen housekeeping o constitutivo. Para tal fin, se realizó el procedimiento previamente estandarizado por el Laboratorio de Macrófagos y Receptores Nucleares de la Facultad de Farmacia, Universidad Paul Sabatier, Toulouse III, Francia. Este procedimiento estandarizado se describe en las publicaciones de los investigadores del laboratorio como Aubouy A, Lefèvre L, Olganier D y Coste A (104–106) y ha sido realizado en un equipo LightCycler 480 system (Roche Diagnostics) usando LightCycler SYBR Green I Master (Roche Diagnostics). Los primers fueron diseñados por los analistas del Laboratorio utilizando el software Primer 3 y son listados en el Anexo 01. El RNAm de  $\beta$ -actina fue usado como control invariante o housekeeping. Se usaron un pool de muestras de DNAc diluidas serialmente como estándares externos en cada corrida para la cuantificación y los resultados fueron expresados como veces de inducción relativa respecto al control invariante.

Los monocitos-macrófagos de 02 donantes, luego del tratamiento por triplicado con UT-TOA (25ug/mL, concentración final) durante 6h o 16h, fueron sometidos a un proceso de lisis celular para la obtención del material genético. A partir de este material se procedió a realizar un RT-PCR en dos pasos (107) donde primero se convirtió el RNA a DNA por una transcripción reversa, luego con la ayuda de primers o cebadores específicos de los genes a medir, se hizo una reacción de PCR que llevo a la cuantificación de este material genético en un equipo LightCycler 480

system (Roche Diagnostics) usando LightCycler SYBR Green I Master (Roche Diagnostics) (108).

## **Procedimiento del ensayo de qRT-PCR**

### **4.10.1. Obtención de monocitos-macrófagos adherentes y tratamiento con UT-TOA**

- Se utilizaron leucocitos provenientes 02 donantes, los que fueron obtenidos según el procedimiento 4.5. En este caso los monocitos-macrófagos fueron cultivados por triplicado en placas de 48 pozos a razón  $0,45 \times 10^6$  células/pozo y un grupo fue tratado con 60uL de UT-TOA a la concentración de 25ug/mL, mientras que el otro grupo (control negativo CN) no recibió el tratamiento, en su lugar se completo con 60uL de medio de cultivo SFM.
- Las células fueron tratadas por 6h o 16h con UT-TOA, luego fueron lavadas 1 vez con HBSS+, se les agregó 350uL/pozo de solución de lisis (RLT) y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **4.10.2. Extracción de RNA**

- Se utilizo el kit extracción EZ-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super Kit (Bio Basic) y se siguieron estrictamente las instrucciones del fabricante, brevemente.
- Se descongelaron las células lisadas con la solución RLT.
- Se agregaron 350uL de etanol al 70% y se homogenizó.

- La solución se colocó en columnas de extracción y se centrifugó 1min a 8000rpm.
- Se eliminó el líquido que atravesó la columna y se agregó 500uL de tampón de lavado (RW) y se centrifugó 1min a 8000rpm.
- Se eliminó el líquido que atravesó la columna y se agregó 500uL de solución RPE de lavado (RW) y se centrifugó 1min a 8000rpm.
- Se eliminó el líquido que atravesó la columna y se centrifugó 1min a 8000rpm.
- Las columnas se colocaron en tubos de 1,5mL, se les agregó 30uL de agua estéril libre de RNAsas y se colocaron 2min en un baño maria seco a 50°C.
- Se centrifugó 1min a 8000rpm y el RNA se almacenó a -80°C.

#### **4.10.3. Transcripción reversa**

- La síntesis del DNA complementario (DNAC) fue realizada a partir de RNA total (un mínimo de 100ng) usando el kit Verso cDNA – Thermo Scientific, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (109). El producto de la transcripción reversa fue alicuotado y almacenado a -80°C.
- Para cada muestra se preparo un mix con los siguientes reactivos:
  - 5X cDNA buffer            4uL
  - dNTP                            2uL
  - RNA primer (oligodT)    1uL
  - RT enhancer                 1uL

- Verso enzyme                      1uL
- H<sub>2</sub>O miliQ qsp                      6uL
- Se mezcló todo excepto la enzima y se vortexeó.
- Se agregó la enzima y se mezcló con micropipeta.
- A cada tubo se le agregó 15uL del mix y 5uL de RNA previamente vortexeado y centrifugado (spin).
- Se centrifugaron los tubos y se realizó la transcripción reversa en un termociclador Gene Cycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad, siguiendo las siguientes condiciones:
  - Incubación: 30min a 42°C/Inactivación: 2min a 95°C

#### **4.10.4. Diluciones del DNAc y RT-PCR**

- Se hicieron diluciones seriadas (1/5, 1/10, 1/20, 1/50) del DNAc para hacer una curva estándar que muestre la linealidad y la eficiencia del ensayo.
- Las muestras de DNA se diluyeron 1/10.
- Los primers sentido y anti-sentido se diluyeron 1/20 y se usaron a una concentración final de 0,5uM.
- Se preparó un mix de primer para cada gen teniendo en cuenta que se las muestras de los grupos de tratamiento con o sin UT-TOA, agua como control y diluciones seriadas del DNAc de todas las muestras juntas (muestras+H<sub>2</sub>O+Diluciones DNAc):
  - SYBR (Syber Green)                      3uL
  - Primer R (sentido)                      1uL

- Primer L (anti-sentido)            1uL
  - H<sub>2</sub>O miliq                            3uL
- Se agregaron en una placa para RT-PCR 8uL del mix de primers (incluyendo el primer de referencia de  $\beta$ -actina) y 2uL de la muestra, control de agua y diluciones de DNAC.
  - Se cubrió la placa con cinta adhesiva, se centrifugó a 1200rpm durante 1min y se colocó en un equipo LightCycler 480 system (Roche Diagnostics) y se corrió el programa SYBR Green I 384II durante 1h30min.
  - El volumen de reacción fue de 10uL y los ciclos de amplificación fueron 60 (10s a 95°C y 60s a 60°C) pero el número de ciclos necesarios para la amplificación (Cp) de la mayoría de genes estuvo entre 26 – 36.
  - Los datos obtenidos fueron analizados con el software del mismo equipo.
  - El análisis realizado se inicio primero evaluando que el carril correspondiente al agua (H<sub>2</sub>O) no diera ninguna señal por tratarse de un control negativo. Luego se evaluó la linealidad de la curva estándar realizada con las diluciones del DNAC verificado que el error sea lo más cercano a cero y que la eficiencia se acercara a 2,0.
  - Se evaluó la expresión del RNAm de  $\beta$ -actina y sólo si este se expresaba se continuaba con la evaluación de los demás RNAm.
  - El método de análisis empleado es la cuantificación relativa a través del método Livak y en este caso el programa Light Cycler 480 de Roche utiliza la formula de la segunda derivada (Abs quant/2<sup>nd</sup> Derivation Max) para calcular directamente los valores de Cp y la concentración que refleja

la expresión del RNAm (107,110). Para obtener la expresión relativa normalizada se dividió los valores de concentración de cada mensajero en estudio entre el mensajero de referencia  $\beta$ -actina.

#### **4.11. Medición por citometría de flujo de receptores de superficie en monocitos-macrófagos humanos adherentes tratados con UT-TOA**

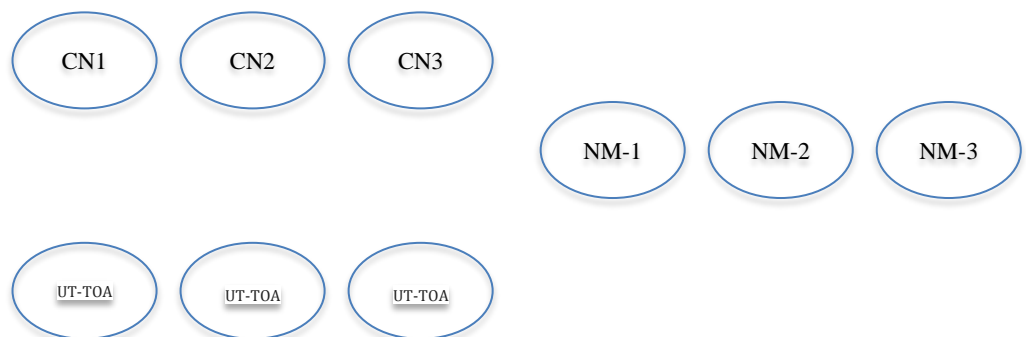
Con este ensayo se hizo seguimiento a los cambios a nivel transcripcional inducidos por UT-TOA de algunos genes, y si estos cambios se reflejaron en la expresión de un grupo de receptores importantes no sólo para la polarización M1/M2 sino también para la actividad de reconocimiento de antígenos a través de receptores de superficie de los monocitos-macrófagos. En este estudio se siguió como patrón de polarización M1/M2 a los marcadores recomendados por Fadini GP et al. y Tedesco S et al. (47,111) con algunas modificaciones, a partir de monocitos-macrófagos CD14+, es decir se determinaron células CD14+CD68+ para M1 y CD14+CD163+ para M2 ambos son receptores tipo scavenger o "barredores" (CD68 y CD163); sin embargo, también se evaluaron otros receptores relacionados no sólo a polarización M1/M2 sino también a la actividad de reconocimiento de antígenos y respuesta de los monocitos-macrófagos humanos. Estos receptores reconocen fundamentalmente estructuras de tipo carbohidrato sobre microorganismos o células neoplásicas. En este estudio se ha medido la expresión de CD16b (Fc $\gamma$ RIII), un receptor que reconoce el extremo Fc de las inmunoglobulinas IgG (usado como marcador para M1). Además, se midieron Dectina tipo 1 (Dec-1); receptor de manosa (MR) o CD206 y DC-SIGN

(Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin) o CD209, todos ellos receptores de lectina tipo C (usados como marcadores M2).

Para este ensayo se usaron monocitos-macrófagos humanos tratados con **UT-TOA** durante 24h y luego las células se marcaron con paneles de anticuerpos específicos para los receptores de membrana para luego proceder a la adquisición y análisis en un citómetro de flujo FACS Calibur (BDBiosciences).

### Procedimiento

- Se obtuvieron monocitos-macrófagos adherentes ( $0,15 \times 10^6$  células) de 05 donantes según el procedimiento 4.5.
- Los monocitos-macrófagos se cultivaron en placas de 24 pozos cada muestra por triplicado (ver esquema). Donde, Controles negativos (CN) y controles no marcados, es decir que no recibieron anticuerpos (NM) fueron cultivados en 600uL de medio SFM; los grupos de tratamiento con **UT-TOA** fueron cultivados en 540uL de medio SFM y 60uL de **UT-TOA** (25ug/mL, concentración final). La placa se incubó durante 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.



Esquema de la distribución de grupos en la placa de cultivo de monocitos-macrófagos.

- Luego de la incubación se lavó la placa 2 veces con sales de Hanks (HBSS+).
- Se agregó a cada pozo 1mL de PBS pH 7,2 frío (PBS-/-).
- Se colocó la placa sobre un recipiente con hielo y se procedió a resuspender el PBS-/- durante 30-60s con la ayuda de una micropipeta.
- Con una paleta tipo "cell scraper" se procedió a raspar la superficie del pozo para remover los monocitos-macrófagos adherentes.
- Las células resuspendidas en el PBS-/- fueron trasvasadas a tubos de citometría conteniendo 1mL de PBS-/- frío.
- Los tubos fueron centrifugados a 1500rpm durante 5 minutos.
- Se descartó el sobrenadante.
- Se agregó 100uL de una solución de PBS 1% SFB conteniendo los paneles de anticuerpos específicos a los tubos respectivos, excepto a los controles NM.
  - Panel 1: Anti-CD68-FITC; Anti-CD163-PerCP.Cy5.5; Anti-CD14-PE
  - Panel 2: Anti-CD206-FITC; Anti-CD209-APC; Anti-Dec-1-PE; Anti-CD16-PerCP.Cy5.5
- Todos los tubos se incubaron por 30-45min en refrigeración.
- Se agregó 1mL de PBS -/- a todos los tubos para lavarlos por centrifugación a 1500rpm durante 5 minutos.

- Se descarto el sobrenadante y a cada sedimento se le agregó 200uL de PBS 1% SFB o Cell Fix (Paraformaldehído 1%).
- Se realizó la adquisición de 5000 eventos según una plantilla estandarizada y compensada para cada uno de los paneles utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). La compensación se realizó con el kit CALIBRITE de BD Biosciences.
- La data fue almacenada en archivos FSC y analizada en el software FlowJo vX.0.7. En el que se determinó los porcentajes de células que presentan positividad para los marcadores indicados en los paneles 1 y 2.

#### **4.12. CBA (Cytometric Bead Array) para citoquinas relacionadas a la polarización M1/M2**

Mediante la técnica de citometría de flujo - CBA se evaluó, en el sobrenadante de cultivo de monocitos-macrófagos adherentes ( $0,15 - 0,20 \times 10^6$ ) de 03 donantes obtenidos según el procedimiento 4.5 y tratados o no por 24h, 48h y 72h con **UT-TOA** (25ug/mL, concentración final), los niveles de las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, y IL-10.

##### **Procedimiento**

Se siguieron estrictamente las indicaciones del fabricante. Brevemente, antes de comenzar con el ensayo:

- Se reconstituyó el estándar antes de realizar las diluciones con 2mL del diluyente del estándar. Se dejó equilibrar durante al menos 15 minutos y se vortexeó para mezclar.

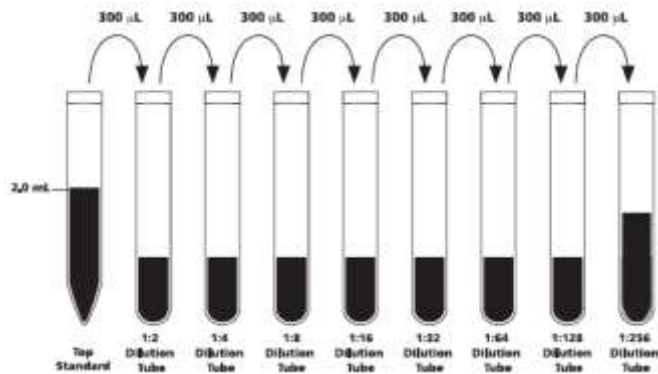
- Se agregaron 300µl del diluyente del estándar a tubos de vidrio con los siguientes rótulos: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256. Las equivalencias de las diluciones con las concentraciones finales se muestran en la tabla a continuación:

**Tabla 5. Curva estándar del ensayo de CBA**

Tubo	Concentración (pg/mL)	Dilución del estándar
1	0	Diluyente
2	20	1:256
3	40	1:128
4	80	1:64
5	156	1:32
6	312,5	1:16
7	625	1:8
8	1250	1:4
9	2500	1:2
10	5000	Top Standard

- Se realizaron diluciones seriadas añadiendo primero 300µL de diluyente del estándar a cada tubo de dilución.
- Se tomó 300uL del "Top Standard" y se agregaron al tubo de la dilución ½, de este tubo se tomaron 300uL y se agregaron al tubo de la dilución ¼ y

así sucesivamente hasta llegar al tubo de la dilución 1/256. El diluyente del estándar servirá como la concentración cero (0pg/ml). Ver esquema siguiente:



- Preparación del “Mix de Captura”:
  - Se determinó el número de tubos de ensayo (incluyendo estándares) requerido para el ensayo.
  - Se vortexeó vigorosamente cada recipiente conteniendo la suspensión de los Beads de captura.
  - Se agregó una alícuota de 10µL de cada Bead de captura por cada tubo de ensayo a ser analizado a un tubo vacío rotulado como “Mix de Captura”. Por ej. 10µL del bead de captura de TNF- $\alpha$  x 18 tubos de ensayo = 180µL de beads de captura de TNF- $\alpha$  y de la misma forma con las demás citoquinas.
  - Se vortexeó vigorosamente.
- Se agregó 50µL de beads de captura a todos los tubos de ensayo.
- Se agregó 50µL de las diluciones del estándar a los tubos para la curva estándar.

- Se agregó 50µL de cada muestra a los tubos para las muestras problema.
- Se agregó 50µL del reactivo de detección de las citoquinas a todos los tubos de ensayo.
- Se incubó todos los tubos de ensayo durante 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz.
- Se agregó 1mL del buffer de lavado a cada tubo de ensayo y se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos.
- Se aspiró y descartó el sobrenadante de cada tubo de ensayo.
- Se agregó 300µL de solución de lavado a cada tubo de ensayo para resuspender el sedimento de los beads.
- Se adquirieron 3000 eventos usando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences) y la guía de adquisición del fabricante disponible en: [http://static.bdbiosciences.com/documents/BD\\_FACSCalibur\\_Flow\\_Cytometer.pdf?\\_ga=2.89009563.1466645503.1508714468-61059819.1492868634](http://static.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_Flow_Cytometer.pdf?_ga=2.89009563.1466645503.1508714468-61059819.1492868634) y los resultados fueron analizados por el software FCAP Array™ Software, Soft Flow Hungary Ltd. for BD Biosciences.
- Finalmente, los resultados se expresan en concentración de cada citoquina en unidades de pg/mL.

#### **4.13. Cultivo de línea celular B16 e inducción de tumor en ratones C57/BL6**

La línea celular B16/BL6, típicamente utilizada para la inducción de melanoma murino (112), fue gentilmente donada por el Dr. Claudio Acuña

(Universidad Santiago de Chile). Las células B16/BL6 se mantuvieron en cultivo en medio RPMI-1640 completo (suero fetal bovino al 10%, penicilina 100U/mL, estreptomina 100ug/mL) y piruvato de sodio al 0,01%, en una atmosfera húmeda a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El cultivo se mantuvo hasta una confluencia del 70%, luego las células fueron tripsinizadas por 10 minutos (tripsina-EDTA 0,25%), lavadas, contadas y resuspendidas en PBS pH 7,2.

La dosis estandarizada para la inoculación subcutánea en el flanco izquierdo de la región abdominal del animal fue de  $1 \times 10^5$  células en 100uL de PBS. A partir del día de la inoculación (día 0) en adelante los animales fueron observados diariamente hasta el día del sacrificio por dislocación cervical. Los tumores fueron detectados por palpación digital. Al respecto, Overwijk W et al (112) menciona que el crecimiento de los tumores varia entre 14 y 21 días y que depende de la técnica con que se inoculan las células debiéndose apreciar una ampolla en el sitio de la inoculación, esto determinará el tiempo de aparición del tumor, ya que puede haber mucho o poco inóculo. Asimismo, se usa el seguimiento del tamaño del tumor porque incluso se podría alcanzar un tamaño muy grande antes del día 21 o 22 y los tumores se necrosarían y sangrarían demasiado.

Se utilizaron dos esquemas de tratamiento: (1) Administración diaria de UT-TOA o vehículo diluyente 7 días antes de la inducción del tumor y 22 días o cuando los tumores alcanzaban un tamaño de 4,5mm. después. (2) Administración diaria de UT-TOA o vehículo diluyente 7 días antes de la

inducción del tumor y 14 días después o cuando los tumores alcanzaban un tamaño de 4,5mm.

#### **4.14. Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)**

En el caso de los estudios en sangre periférica de ratones, el día 22 se obtuvieron muestras por punción cardíaca de cada ratón (aproximadamente 1mL) y se realizó un pool de 2 a 3 animales para obtener la cantidad de células necesarias para los ensayos. Con estos pooles se realizó el aislamiento de PBMC mediante la técnica de gradiente de centrifugación con Histopaque 1,083g/mL (Sigma, St Louis, MO, USA).

##### **Procedimiento**

- Previamente, se preparó tubos de polipropileno con 3mL de Histopaque.
- Se diluyó la muestra de sangre en partes iguales con RPMI-1640 completo (Sigma, St Louis, MO, USA) a temperatura ambiente (TA).
- Se agregó la muestra de sangre diluida (6mL) al tubo que contiene el Histopaque y se centrifugó a 1800 rpm a TA por 30 minutos, sin utilizar freno.
- Se recuperó con una pipeta de transferencia el anillo celular formado en la parte intermedia (capa de células mononucleares) y se vertió a otro tubo (Fig. 13).



**Figura 13. Aislamiento de PBMC en sangre de ratones.**

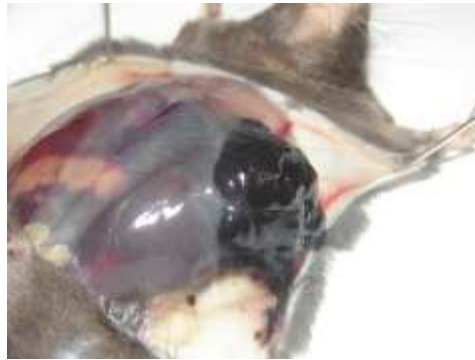
Gradiente de centrifugación con Histopaque (densidad=1,083g/mL) a partir de un pool de muestras de sangre periférica obtenidas por punción cardiaca. Para los ensayos experimentales se utilizaron  $5 \times 10^4$  células por pozo y por triplicado.

- Se lavó dos veces con 15mL de RPMI-1640 completo a TA el primer lavado y a 4°C el segundo lavado por diez minutos a 2500rpm. En el primer lavado se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en RPMI-1640 completo.
- Después del segundo lavado se procedió de la misma manera pero se resuspendió en 1mL de RPMI-1640 completo a 4°C.
- Se contaron las células en una cámara de Neubauer, relación 1:1 con el colorante azul de Trypan (Sigma, St Louis, MO, USA). Finalmente, se calculó la cantidad de células necesarias a ensayar.
- Una vez aisladas las PBMC, se sembraron  $5 \times 10^4$  células por cada 100uL de suspensión en tubos estériles y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en RPMI 1640 completo por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo para la medición de citoquinas y las células fueron marcadas con anticuerpos específicos.

#### **4.15. Aislamiento de células mononucleares del microambiente tumoral (MTMC)**

##### **4.15.1. Extracción y homogenización del tumor sólido**

La primera parte del procedimiento consiste en obtener los tumores sólidos subcutáneos (Fig.14), los cuales fueron removidos quirúrgicamente de la zona abdominal de cada animal y se colocaron en solución salina estéril a 4°C para conservarlos antes de la homogenización.



**Figura 14. Tumor de melanoma subcutáneo**

Tumor sólido inducido por inoculación de  $10^5$  células en el flanco izquierdo del abdomen de en ratones C57BL/6.

##### **Procedimiento**

- El tumor sólido obtenido fue fraccionado extensivamente con la ayuda de tijeras quirúrgicas y con los bordes rugosos de 2 láminas portaobjetos sobre una placa Petri para permitir la liberación celular.
- Se agregó 1mL de colagenasa tipo I, 0,5% p/v (Gibco, USA) para facilitar la digestión del tejido restante.

- Se incubo durante 30 minutos a 37°C con agitación del recipiente cada 10 minutos.
- La suspensión resultante se paso por un filtro de gasas estériles dentro de la cabina de bioseguridad obteniendo una suspensión en un tubo cónico.

#### **4.15.2. Gradiente de centrifugación**

La segunda parte del procedimiento consiste en la separación celular (MTMC) en base a la densidad de sus células, la cuales tienen la misma densidad que el reactivo Histopaque por lo que es posible su separación por centrifugación controlada.

- La suspensión obtenida en el procedimiento anterior (aprox. 8mL) se agrego lentamente sobre un tubo conteniendo 4mL de Histopaque (d=1,083g/mL), Sigma, St Louis, MO, USA) a temperatura ambiente.
- Se centrifugo el recipiente a 1800rpm (450xg) durante 30 min. sin freno.
- Se recuperó el anillo celular (MTMC) (Fig. 15)



**Figura 15. Aislamiento de MTMC.**

Gradiente de centrifugación a partir del tumor digerido con colagenasa tipo I. Se obtuvo el anillo de células blanquecino que se muestra en la figura.

- Se realizaron 2 lavados con 13mL de RPMI-1640 incompleto, el primero a temperatura ambiente y el segundo a 4°C durante 10 minutos a 2500 rpm (750xg).
- Luego de descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1mL de medio RPMI-1640 completo.
- Se realizó el conteo con Trypan Blue y se ajustaron las cantidades de células para tener  $2 \times 10^5$  MTMC por cada 100uL de medio RPMI-1640 completo.
- Todos los tubos conteniendo células fueron incubados por 24h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.16. Determinación del porcentaje de linfocitos y células dendríticas por citometría de flujo en PBMC y/o MTMC de ratones con melanoma tratados con UT-TOA**

En este ensayo se evaluaron marcadores de superficie no sólo para la identificación de poblaciones inmunocompetentes sino también

marcadores relacionados con el nivel de activación de estas células. Para realizar el marcaje adecuado se realizó una previa titulación de los anticuerpos monoclonales específicos para encontrar la dilución o título al cual la relación señal/ruido es la máxima. Este procedimiento permitió controlar el ruido o "background" que se origina por la autofluorescencia, la superposición espectral o la unión inespecífica de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos de superficie fueron adquiridos todos de Becton Dickinson, San Jose, CA, USA: CD4-PE (1/100); CD8a-APC (1/400); CD69-PerCP (1/800); CD3e-PerCP (5ug/mL); CD4-FITC (0,25ug/mL); CD8a-PE (2ug/mL) y CD44-APC (4ug/mL); NK1.1-APC (4ug/mL); CD11c-APC (1/800); CD11b-FITC (1/1200). Asimismo, la compensación y adquisición fueron realizados dos citómetros de flujo, un FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, USA) para muestras de PBMC y un FACSCanto II (BD Immunocytometry Systems, USA) para muestras de MTMC.

### **Procedimiento**

- En todos los casos se agregaron 100uL de PBS conteniendo combinaciones de anticuerpos monoclonales distintos según la población a evaluar al sedimento celular de PBMC o MTMC contenido en un tubo para citometría.

**Tabla 6. Marcadores utilizados para evaluar poblaciones inmunocompetentes a nivel sistémico (PBMC) y en el microambiente tumoral (MTMC)**

Origen	PBMC		MTMC	
Tipos	Helper	Citotóxico	Helper	Citotóxico
LT vírgenes	CD3e+CD4+	CD3e+CD8a+	CD4+	CD8a+
LT activados	CD4+CD44+	CD8a+CD44+	CD4+CD69+	CD8a+CD69+
			Otros Linfocitos y DC	
NK	----	----	NK1.1+CD3-	
DCm	----	----	CD11c+CD11b <sup>Brigh</sup>	
DCp	----	----	CD11c+CD11b <sup>Low/-</sup>	

LT: Linfocitos T; NK: Natural Killer; DC: Células dendríticas; m: mieloides; p: plasmacitoides.

- Se incubaron los tubos durante 30 minutos entre 2 – 8 °C.
- Se lavaron los tubos dos veces con 1mL de Cell Wash (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) a 1800rpm.
- El sedimento obtenido se resuspendió en 500uL de cell fix (paraformaldehído al 1%, en PBS pH 7,4).
- Se realizó la adquisición de 1000 eventos según una plantilla estandarizada y compensada para cada una de las poblaciones indicadas en la Tabla 6 utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). La compensación se realizó con el kit CALIBRITE de BD Biosciences.
- La data fue almacenada en archivos FSC y analizada en el software FlowJo vX.0.7.

#### **4.17. CBA (Cytometric Bead Array) para citoquinas del sobrenadante de cultivo de PBMC y/o MTMC**

Para la evaluación de citoquinas por citometría de flujo se utilizaron los sobrenadantes de cultivo de PBMC y MTMC y se utilizaron los kits BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA), código 560485 (mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit) <http://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/others/23-12380.pdf> y código 552364 (mouse inflammation kit) <http://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/others/23-12720.pdf> para la medición de las citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ); Th2 (IL-6, IL-10) para PBMC y MTMC y Th17 (IL-17A); IL-12p70 y MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos) sólo en MTMC. Se siguió el procedimiento indicado en 4.12 con algunas variaciones. Se adquirieron 3000 eventos en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Immunocytometry Systems, USA) y el análisis de datos se hizo en el software BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array Software, versión 1.4.

#### **4.18. Análisis estadístico**

Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  EEM (Error Estándar de la Media). El análisis estadístico ha sido realizado con el software GraphPad Prism version 5.00 for Mac, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Los ensayos de **LDH y Citometría de flujo para marcadores de superficie** fueron evaluados por ANOVA de dos vías por medidas repetidas u ordinario usando comparaciones múltiples y test pos hoc de Bonferroni y Sidak, respectivamente. El **ensayo**

**de apoptosis** fue evaluado por ANOVA de una vía por medidas repetidas usando comparaciones múltiples y test pos hoc de Dunnet. Los **ensayos de ROS** se evaluaron con ANOVA ordinario y test pos hoc de Bonferroni y en algunos caso un test de tendencias lineares. La medición de **ROS frente a *C. albicans*** se evaluó con un Test-t pareado de dos vías e intervalo de confianza de 95%. Los **ensayos de qRT-PCR y Citoquinas** se realizaron con ANOVA de dos vías por medidas repetidas usando comparaciones múltiples para el tratamiento (UT-TOA) y el tiempo (h) y test pos hoc de Sidak.

En los ensayos relacionados al **modelo de melanoma murino** tanto la relación de **LT CD4/CD8a** como la medición de **citoquinas** fueron evaluados por una ANOVA ordinario de una vía y test pos hoc de Dunnett. En cuanto a las **citoquinas** se hizo un test-t de una cola no pareado adicional y sólo mostro significancia para la IL-17A. Los **porcentajes de linfocitos y células dendríticas** fueron evaluados por el test de Mann-Whitney de una cola. Se hicieron tests de **Correlaciones de Pearson ( r )** para las relaciones de linfocitos CD4/CD8a y porcentajes poblacionales de linfocitos y células dendríticas comparadas contra la citoquinas analizadas. En todos los casos valores de probabilidad menores a  $p < 0,05^*$  o  $p < 0,01^{**}$   $p < 0,001^{***}$  o  $p < 0,0001^{****}$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Viabilidad celular

La evaluación de la viabilidad de monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA en el rango de concentraciones de 6,25 – 400ug/mL durante un período de 24h indican que el valor de IC50 es de 107,1ug/mL, es decir, que esta sería la concentración que estaría eliminando el 50% de estas células en el tiempo indicado. El valor de IC50 se ha obtenido promediando los triplicados de cada uno de los 07 donantes distintos (Figura 16).

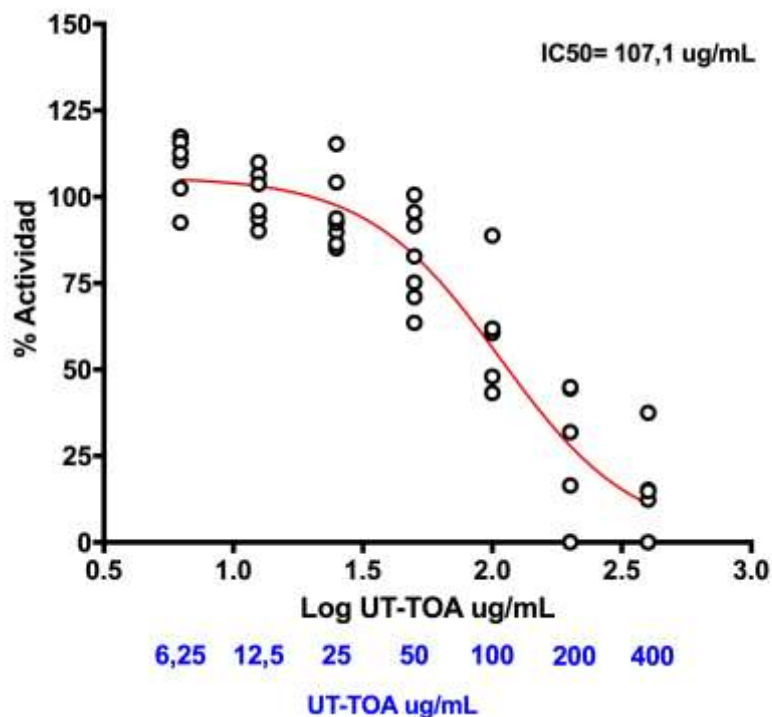


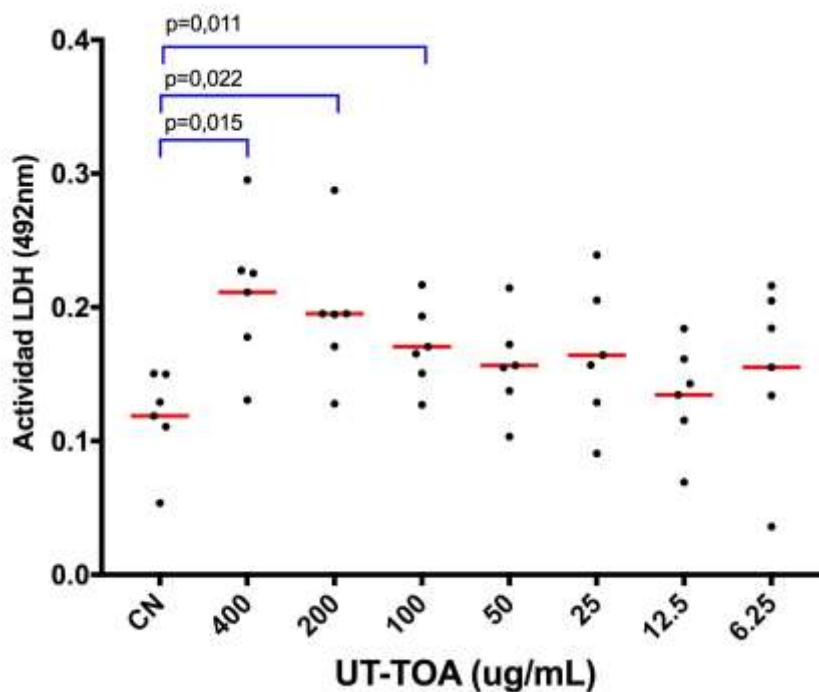
Figura 16. Determinación de IC50 de UT-TOA por el ensayo de MTT con corrección del efecto colorimétrico.

Gráfica representativa del promedio de 07 donantes de muestras de monocitos-macrófagos adherentes ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) tratados con UT-TOA (6,25 – 400ug/mL) durante 24h. La gráfica representa una regresión no lineal sigmoide de tipo dosis-respuesta donde: % **Actividad**= Actividad sobre la viabilidad celular de la muestra comparada a la viabilidad del control negativo (CN) cuya absorbancia representa el 100%; **Log (UT-TOA ug/mL)** = Logaritmo de base 10 de las concentraciones de UT-TOA (6,25 – 400ug/mL); **IC50** = Antilogaritmo de Log de la concentración que produce el 50% muerte celular. Cada

punto representa el promedio de 07 donantes  $\pm$  error estándar de la media. **UT-TOA** = Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales.

## 5.2. Citotoxicidad

La medición de la actividad de la LDH en el sobrenadante de cultivo de 06 donantes de monocitos-macrófagos que fueron tratados por 24h con UT-TOA (6,25 – 400ug/mL) dió como resultado que el extracto tenía actividad citotóxica en el rango 100 a 400ug/mL, la cual es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al CN; mientras que en el rango de 6,25 a 50ug/mL no hay actividad significativa de la LDH con respecto al CN. Por lo tanto, en este rango el extracto no es citotóxico para monocitos-macrófagos adherentes (Figura 17).



**Figura 17. Citotoxicidad de UT-TOA por el ensayo de LDH.**

La gráfica representa la actividad de la LDH en el sobrenadante de cultivo de 06 muestras distintas de monocitos-macrófagos adherentes ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) tratados con UT-TOA (6,25 – 100ug/mL) por 24h. La gráfica representa el promedio  $\pm$  error estándar de la media donde: **Actividad LDH**= Absorbancia del sobrenadante de cultivo medida a 490nm; **UT-TOA** = Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos. Two-

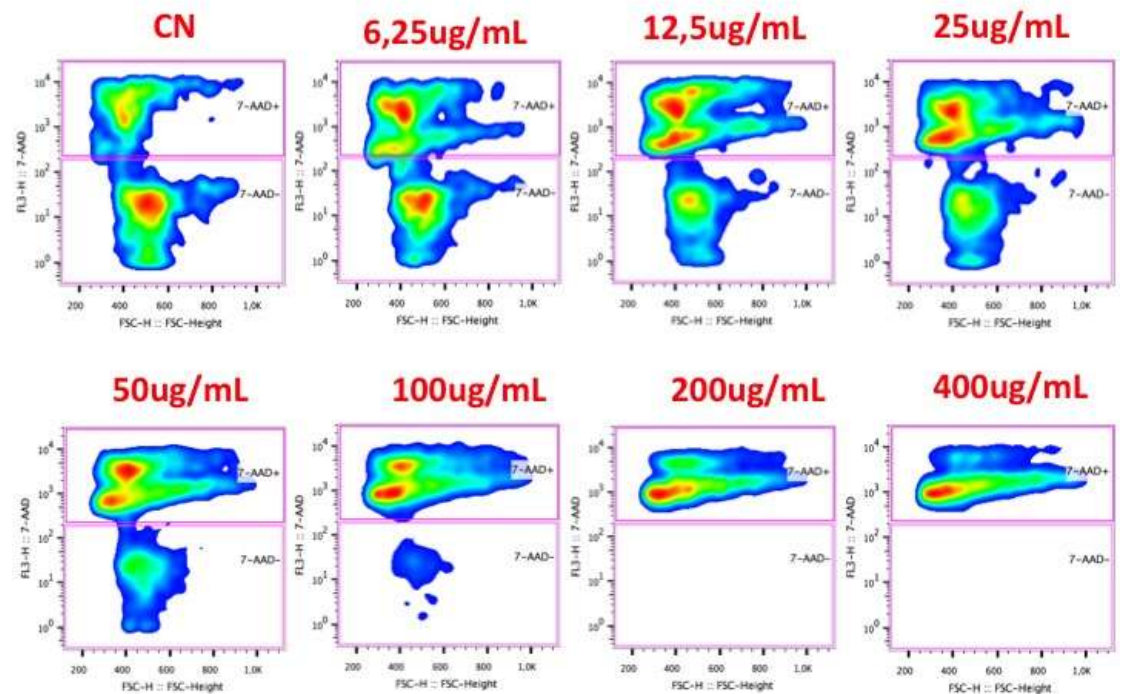
way ANOVA para medidas repetidas por comparación múltiple de medias y test pos hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Significancia estadística si  $p < 0,05^*$ .

### **5.3. Apoptosis**

Adicionalmente se evaluó en 04 donantes cada uno por triplicado el nivel en porcentaje de muerte celular por apoptosis y la viabilidad celular inducida por UT-TOA en cultivos de monocitos-macrófagos enfrentados durante 24h y 48h en un rango de concentraciones de 6,25 – 400ug/mL. Se consideró que a priori existía un porcentaje de apoptosis basal producto de la manipulación de las células y de no permanecer bajo sus condiciones estándar de cultivo, por esta razón se normalizó el ensayo restando al mismo control negativo (CN) y a todos los grupos de tratamiento con UT-TOA el porcentaje basal de apoptosis del CN. Por otro lado, la viabilidad se obtuvo de la diferencia entre el 100% de viabilidad y el porcentaje de apoptosis del CN y de los grupos de tratamiento con UT-TOA. En la figura 18 se muestra una gráfica de citometría representativa de la determinación de apoptosis/viabilidad con el colorante 7-AAD.

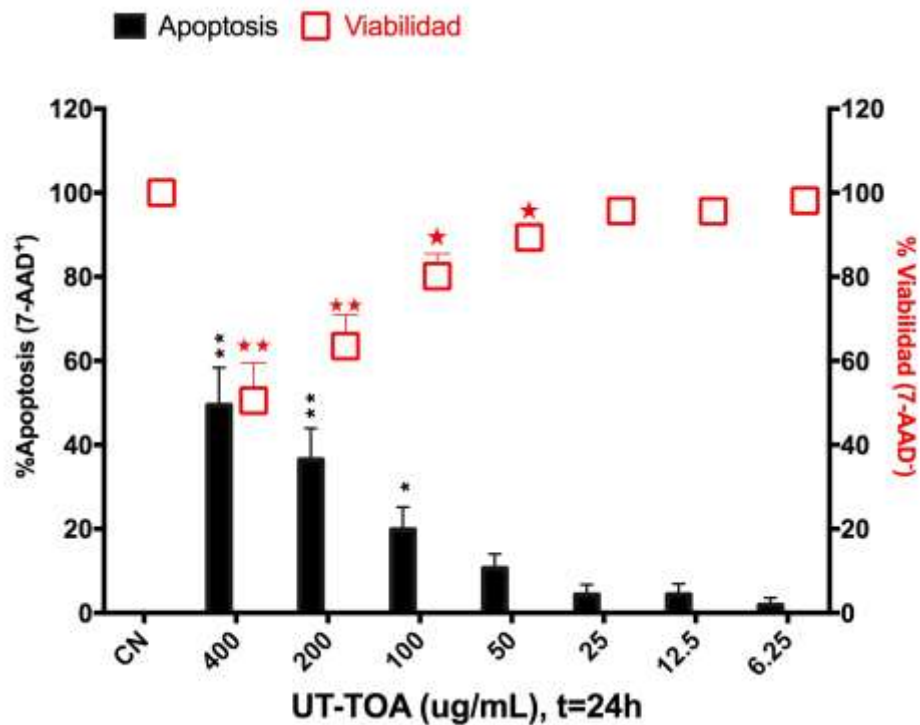
Como se observa en la Fig.19 a las 24h y en el rango de 100 – 400ug/mL de UT-TOA se presentan los mayores porcentajes de apoptosis comparados al grupo CN ( $p < 0,05$ ), llegándose incluso a un promedio de 49,5% a la concentración de 400ug/mL, es decir, en el rango de 6,25 – 100ug/mL el extracto de UT-TOA no induce apoptosis. En cuanto a la viabilidad (Fig. 19), la evaluación estadística indica que a partir de los 50ug/mL la viabilidad de los monocitos-macrófagos ya empieza a disminuir, aunque se debe destacar que el valor de p es de 0,0489, es decir, a pesar de que hay significancia estadística el valor es muy alto, por tanto,

se considera que la viabilidad empieza a disminuir en el rango de 100 – 400ug/mL, rango que se correlaciona mejor con el nivel de apoptosis encontrado.



**Figura 18. Inducción de apoptosis y evaluación de viabilidad celular luego del tratamiento con UT-TOA. Determinación por citometría de flujo con 7-AAD - Gráfica de Citometría**

La gráfica es representativa de un experimento independiente de monocitos-macrófagos adherentes ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) tratados con UT-TOA (6,25 – 400ug/mL) por 24h. El porcentaje de apoptosis del CN ha sido restado al resto de los tratamientos para normalizar el ensayo; mientras que la negatividad al colorante 7-AAD- reflejó la viabilidad de las células. **CN**= control negativo; **UT-TOA(ug/mL)**= extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; **7-AAD** = 7 aminoactinomicina D. **FSC** = forward scatter, dispersión frontal de la luz láser que incide sobre las células.

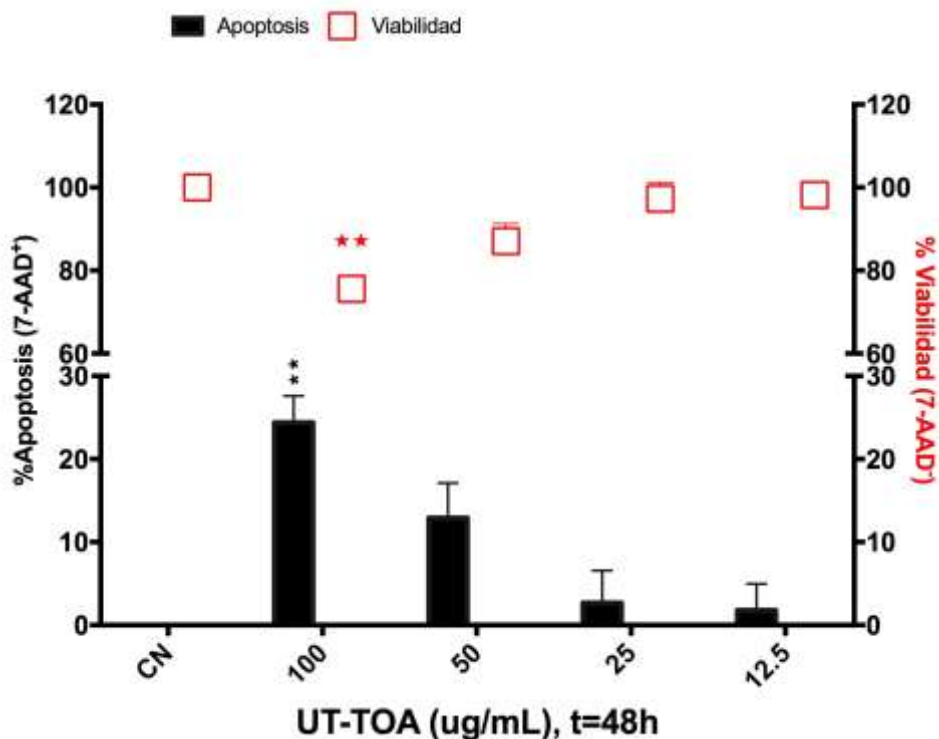


**Figura 19. Inducción de apoptosis y evaluación de viabilidad luego del tratamiento con UT-TOA por 24h determinadas por citometría de flujo con 7-AAD.**

La gráfica es representativa de experimentos independientes por triplicado de 04 muestras distintas de monocitos-macrófagos adherentes ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) tratados con UT-TOA (6,25 – 400ug/mL) por 24h. La positividad de fluorescencia para el colorante 7-AAD<sup>+</sup> refleja la muerte celular por apoptosis de las células enfrentadas o no a UT-TOA; mientras que la negatividad al colorante 7-AAD<sup>-</sup> refleja la viabilidad de las células. Ambas gráficas representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media donde: **%Apoptosis**= Porcentaje de células 7-AAD<sup>+</sup> calculado en base a la resta del %Apoptosis promedio del CN (Apoptosis basal) a todos los grupos UT-TOA; **%Viabilidad**= Porcentaje de células 7-AAD<sup>-</sup> calculado a partir del 100% de viabilidad del CN; **UT-TOA(ug/mL)**= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; **7-AAD** = 7 Aminoactinomicina D. ANOVA one-way para medidas repetidas y test pos hoc de Dunnett. Significancia estadística si  $p < 0,05^{*/\dagger}$  o  $p < 0,001^{**/\ddagger}$

Aunque al tiempo de 48h solo fue posible evaluar la apoptosis/viabilidad en el rango de concentraciones de 12,5 – 100 ug/mL de UT-TOA se observó que entre 12,5 – 50ug/mL no existía inducción significativa de apoptosis y que la viabilidad se mantenía alta comparada con el CN. A la concentración de 100ug/mL de UT-TOA se evidenció no sólo un incremento de la apoptosis sino también una disminución de la viabilidad

celular (Figura 20). A esta misma concentración se observó un comportamiento similar a las 24h.



**Figura 20. Inducción de apoptosis y evaluación de viabilidad luego del tratamiento con UT-TOA por 48h determinada por citometría de flujo con 7-AAD.**

La gráfica es representativa de experimentos independientes por triplicado de 02 muestras distintas de monocitos-macrófagos adherentes ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) tratados con UT-TOA (12,5 – 100ug/mL) por 48h. Ambas gráficas representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media donde: **%Apoptosis**= Porcentaje de células 7-AAD<sup>+</sup> calculado en base a la resta del %Apoptosis promedio del CN (Apoptosis basal) a todos los grupos UT-TOA; **%Viabilidad**= Porcentaje de células 7-AAD<sup>-</sup> calculado a partir del 100% de viabilidad del CN; **UT-TOA(ug/mL)**= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; **7-AAD** = 7 Aminoactinomicina D. ANOVA one-way para medidas repetidas y test pos hoc de Dunnett. Significancia estadística si  $p < 0,05^*$  o  $p < 0,001^{**/000}$

#### 5.4. Producción de ROS frente al tratamiento con UT-TOA y estímulos inductores del estallido respiratorio

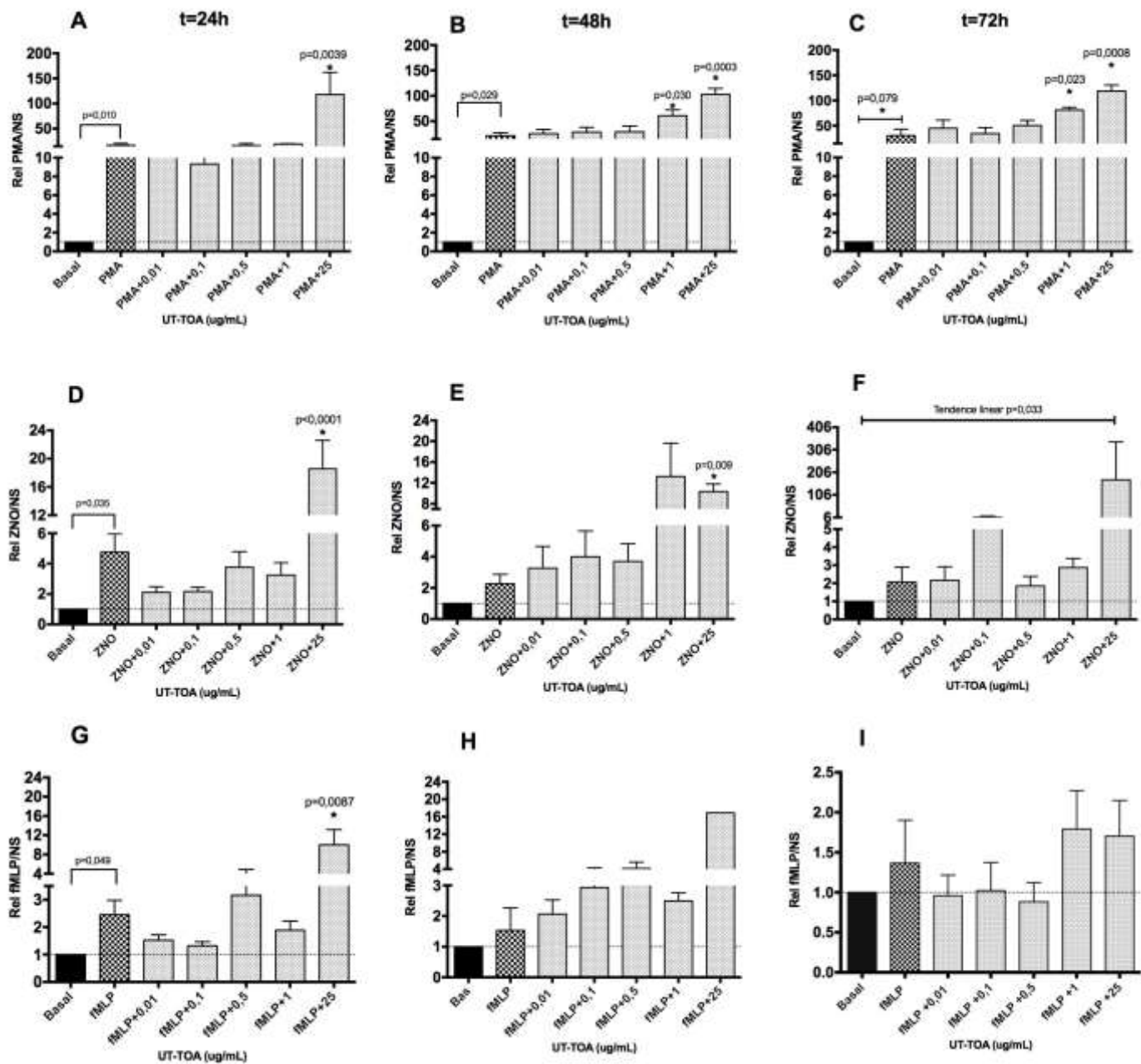
Luego de la evaluación de la actividad citotóxica de UT-TOA se determino que el rango de dosis a partir del cual no existe dicha actividad

era de 6,25 – 100ug/mL. Por tanto, cualquier efecto biológico ejercido por UT-TOA que se pueda dar en este rango no tendría que ser atribuible a la actividad citotóxica del extracto.

A continuación se procedió a determinar la(s) dosis de UT-TOA capaz de incrementar la producción de ROS en el cultivo de monocitos-macrófagos de un total de 04 donantes luego de 2h, 24h, 48h o 72h de tratamiento. En un primer ensayo se evaluó el rango de dosis de UT-TOA de 0,01 – 25 ug/mL (Figura 21) y en un segundo ensayo se evaluaron dosis de UT-TOA de 6,25 – 150 ug/mL (Figura 22 y 23). La evaluación de los resultados de la producción de ROS se realizó previa normalización de las mediciones de quimioluminiscencia debido al "efecto colorimétrico" del extracto de UT-TOA para lo cual se representó gráficamente la relación entre las lecturas de quimioluminiscencia de las células que fueron tratadas o no con UT-TOA y recibieron o no estímulos y las lecturas de quimioluminiscencia de células tratadas o no con UT-TOA pero que no recibieron estímulo (NS).

Los resultados del tratamiento de monocitos-macrófagos con UT-TOA (0,01 – 25ug/mL) durante 2h, posterior cambio de medio e incubación por 24h (Fig. 21A,D,G), 48h (Fig. 21B,E,H) y 72h (Fig. 21C,F,I); primero demuestran que los controles negativo (Basal) y positivo (PMA, ZNO, fMLP) se comportaron correctamente a las 24h pos tratamiento para los tres estímulos utilizados y que a las 48h y 72h pos tratamiento sucedió lo mismo pero sólo para PMA (Basal vs PMA) (Fig.21A,B,C). Por tanto, el análisis resulta siendo válido sólo para estos casos. Los resultados además

demuestran que luego de las 2h de tratamiento con UT-TOA a las 24h posteriores todavía existe un incremento significativo de la producción de ROS superior al de los estímulos (PMA, ZNO y fMLP) a la concentración de 25ug/mL de UT-TOA (Fig. 21 A,D,G). Este mismo comportamiento se mantiene a las 48 y 72h pos tratamiento para el estímulo con PMA, siendo incluso significativo a las dosis de 1 y 25ug/mL de UT-TOA ( $p < 0,05$ ) (Fig. 21 B,C).



**Figura 21. Producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA.**

Las gráficas representan la relación de quimioluminiscencia del Estímulo con/sin UT-TOA vs NS de monocitos-macrófagos ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) ( $n=04$ ) previamente tratados o no por 2h cambio de medio e incubación adicional por 24h (A,D,G), 48h (B,E,H) y 72h (C,F,I) con UT-TOA (0,01 – 25ug/mL) y estimulados o no inmediatamente antes de la medición de ROS con PMA (100nM) (A,B,C); ZNO(50ng/mL) (D,E,F) y fMLP(1uM) (G,H,I). ROS= Especies Reactivas del Oxígeno; UT-TOA(ug/mL)= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; NS= Sin estímulo; PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetate; ZNO = Zymosan; fMLP = *N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar. ANOVA ordinario de una vía y test pos hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Test de tendencias lineares. Significancia estadística si  $p < 0,05^*$  o  $p < 0,001^{**}$ .

En el segundo ensayo, en el que se evaluaron las concentraciones de UT-TOA de 6,25 – 150 ug/mL inmediatamente después del tratamiento continuo por 24 y 48h de monocitos-macrófagos (Figura 22 y 23), se analizó primero la cinética de producción de ROS durante la hora y 30 minutos que duró el ensayo tras el tratamiento y estímulo para lo cual se gráfico los valores promedio de las mediciones triplicadas realizadas por cada minuto durante 1h30min (Figura 22A-F) y además se analizó el promedio de esta cinética, es decir la media de los 90 valores generados durante 1h30min (Figura 23A-F). En el primer caso, se demuestra que la dosis de UT-TOA que claramente incrementa la producción de ROS es la de 25ug/mL tanto a las 24h como a las 48h ( $p < 0,05$ ) (Fig. 22A-F), excepto con el estímulo de ZNO a las 48h (Fig.22E) donde más bien se observó que la concentración de 50ug/mL era la que aparentemente producía un mayor incremento de ROS. La cinética muestra que el tiempo ideal de estimulación de los monocitos-macrófagos con UT-TOA es el de 24h donde la producción de ROS supera en intensidad a la de 48h. Más aún la producción de ROS frente a los tres distintos estímulos es diferente: con PMA el incremento de ROS es ascendente y de mayor intensidad conforme transcurre el tiempo (Fig. 22A); en el caso de ZNO, el incremento es sostenido y constante (Fig. 22B) y con fMLP, se produce un pico de producción de ROS antes de los primeros 10 minutos para después mantenerse en ascenso hasta los 90min que dura la medición (Fig. 22C). Este mismo comportamiento se repite aunque en menor grado

a las 48h (Fig. 22D y F) con excepción de ZNO en el que se incrementa más la producción de ROS a 50ug/mL de UT-TOA (Fig. 22E).

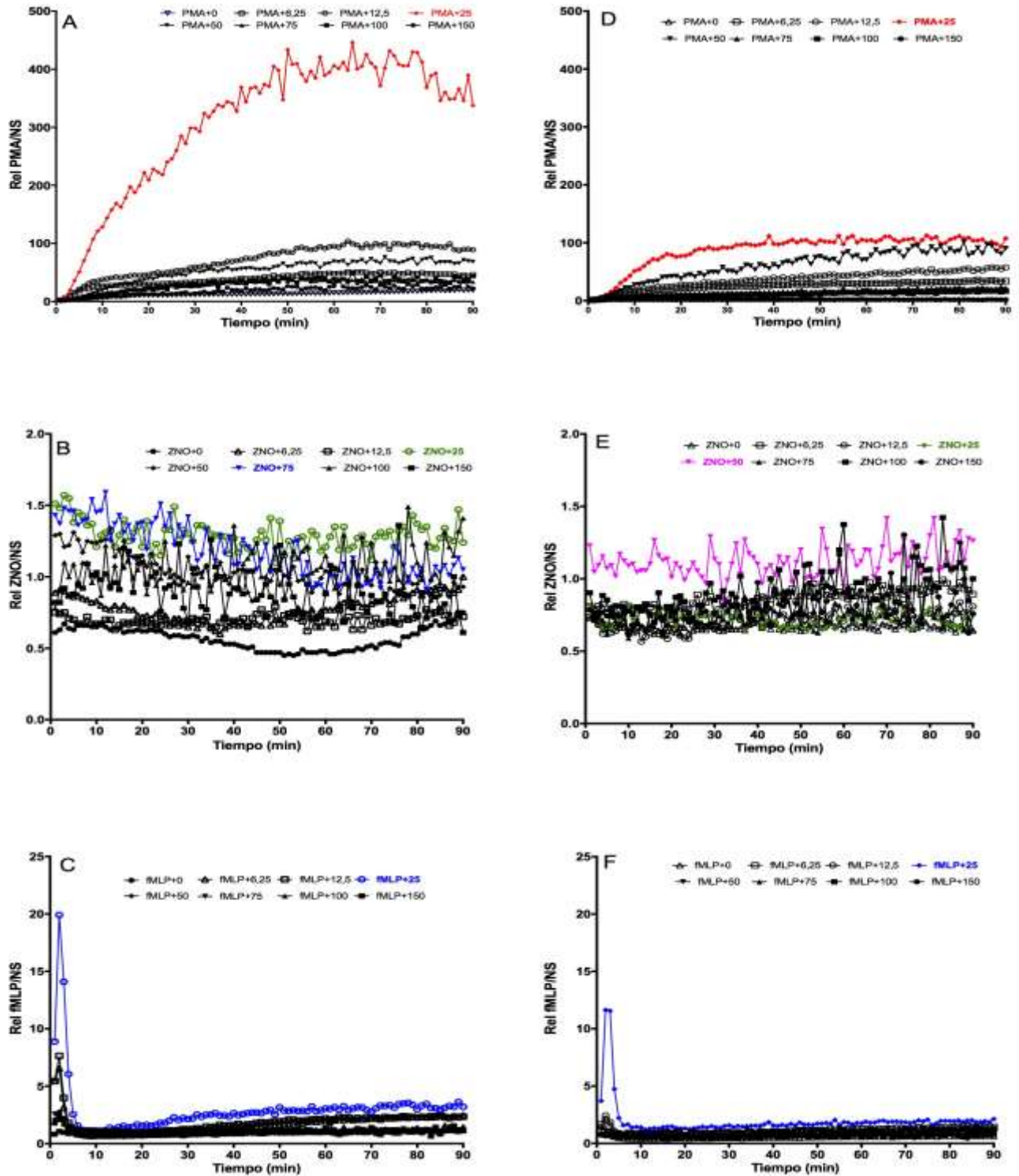
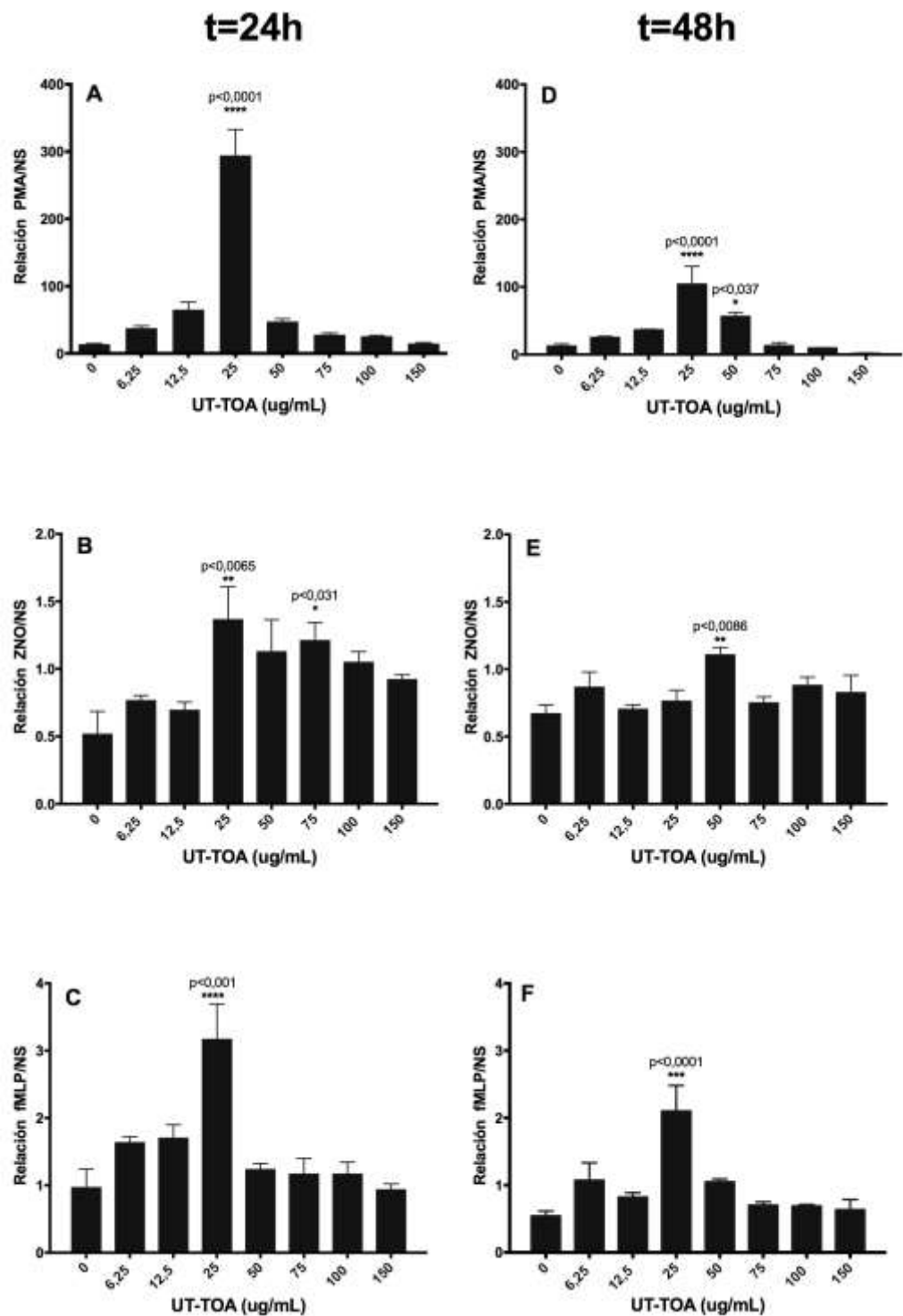


Figura 22. Cinética de producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA por 24h y 48h.

Las gráficas representan la producción de ROS durante 1h30min de monocitos-macrófagos ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) de 02 donantes previamente tratados o no con UT-TOA (6,25 – 150ug/mL) uno por 24h (A-C) y el otro por 48h (D-F) y estimulados o no inmediatamente antes de la medición de ROS con PMA (100nM) (A,D); ZNO(50ng/mL) (B,E) y fMLP(1uM) (C,F). La unidad de medida en el tiempo es la quimioluminiscencia; sin embargo, se representa la relación Estímulo con/sin UT-TOA vs NS. **ROS**= Especies Reactivas del Oxígeno; **UT-TOA(ug/mL)**= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; **PMA** = Phorbol 12-myristate 13-acetate; **ZNO** = Zymosan; **fMLP** = *N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine; **NS** = Con/sin estímulo, sin tratamiento.

Al analizar las relaciones promedio de la producción de ROS y realizar la evaluación estadística se comprueba con significancia estadística que tanto a las 24h como a las 48h el extracto de UT-TOA a la concentración de 25ug/mL logra incrementar la producción de ROS respecto al control sin tratamiento con UT-TOA pero con estímulo (PMA, ZNO o fMLP) (Fig.23A-F); adicionalmente se comprobó que luego de 24h de tratamiento y ante el estímulo de ZNO, UT-TOA a 75ug/ml también es capaz de incrementar la producción de ROS (Fig. 23B), algo similar ocurre ante PMA (Fig.23D) y ZNO (Fig.23E) luego de 48h pero a 50ug/mL de UT-TOA. La intensidad de la relación de producción de ROS es mejor a las 24h de tratamiento con UT-TOA que a las 48h, siendo en el caso del estímulo con PMA hasta 3 veces mayor a las 24h que a las 48h a 25ug/mL de UT-TOA (Fig. 23A y D); y ligeramente superior ante los estímulos con ZNO y fMLP a las 24h de tratamiento que a las 48h (Fig. 23B-F).

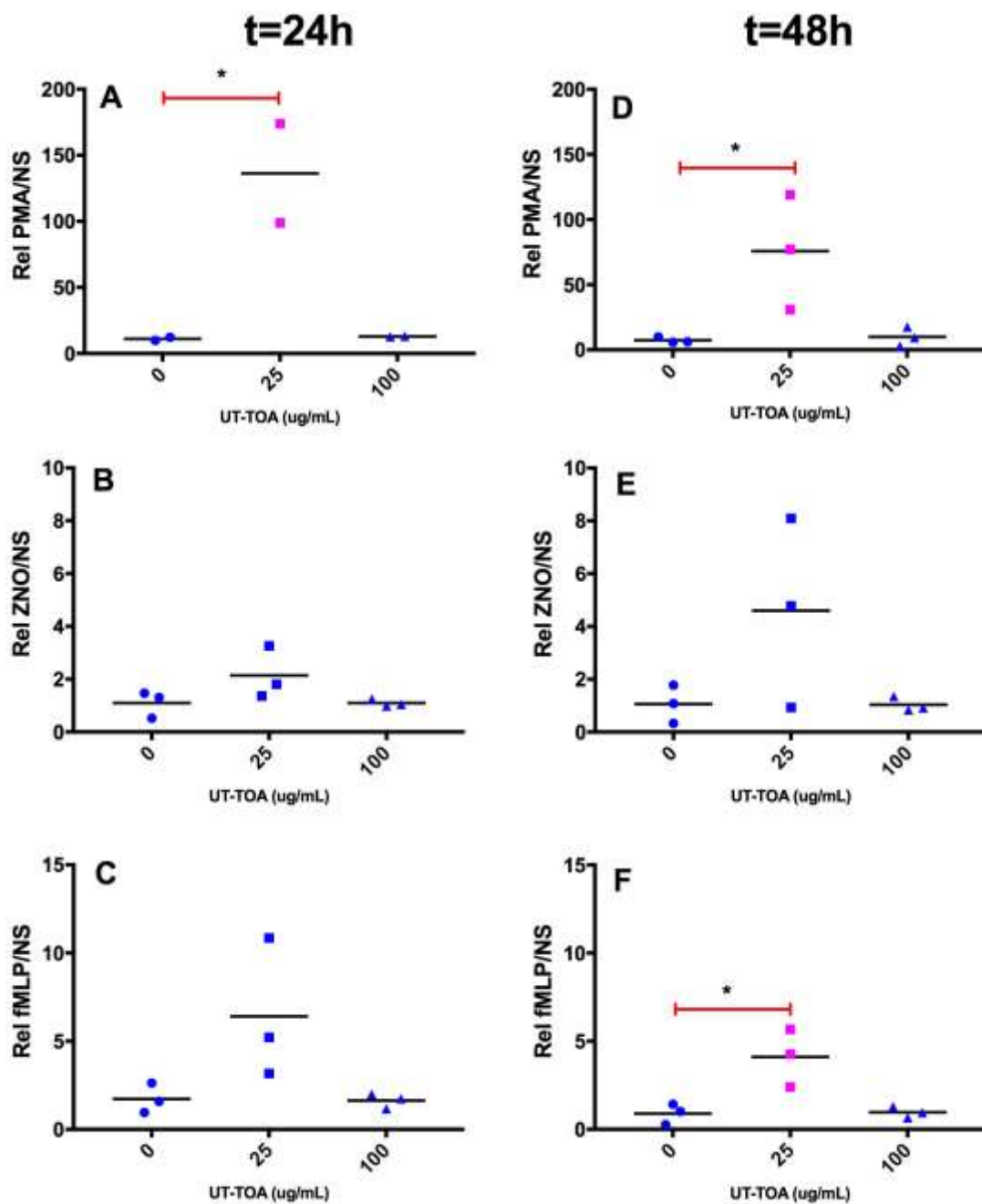


**Figura 23. Producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA (Relación estímulo/No estímulo)**

Las gráficas representan la relación de quimioluminiscencia del Estímulo con/sin UT-TOA vs NS de monocitos-macrófagos ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) de 02 donantes previamente tratados o no por 24h y 48h con UT-TOA (6,25 – 150ug/mL) y estimulados o no inmediatamente antes de la medición de ROS con PMA (100nM) (A y D); ZNO(50ng/mL) (B y E) y fMLP(1uM) (C y F). ROS= Especies Reactivas del Oxígeno; UT-TOA(ug/mL)= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; NS= Sin estímulo; PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetate; ZNO = Zymosan; fMLP = *N*-

Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar. ANOVA ordinario de una vía y test pos hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Significancia estadística si  $p < 0,05$ \* o  $p < 0,01$ \*\*  $p < 0,001$ \*\*\* o  $p < 0,0001$ \*\*\*\*

Según la información anterior se procedió a repetir el ensayo de producción de ROS luego del tratamiento por 24h y 48h con UT-TOA a 25ug/mL y 100ug/mL usando los mismos estímulos (PMA,ZNO,fMLP) en un total 03 muestras de donantes voluntarios de monocitos-macrófagos. Los resultados demuestran nuevamente que la concentración de 25ug/mL de UT-TOA incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) la producción de ROS luego del tratamiento por 24h y estímulo con PMA (Fig. 24A) y por 48h y estímulo con PMA y fMLP (Fig. 24 D y F). En el caso de los estímulos con ZNO (24h y 48h) (Fig. 24B y E) y fMLP (24h) (Fig. 24C) se observó una tendencia al incremento de ROS a la concentración de 25ug/mL pero esta no fue significativa ( $p > 0,05$ ).

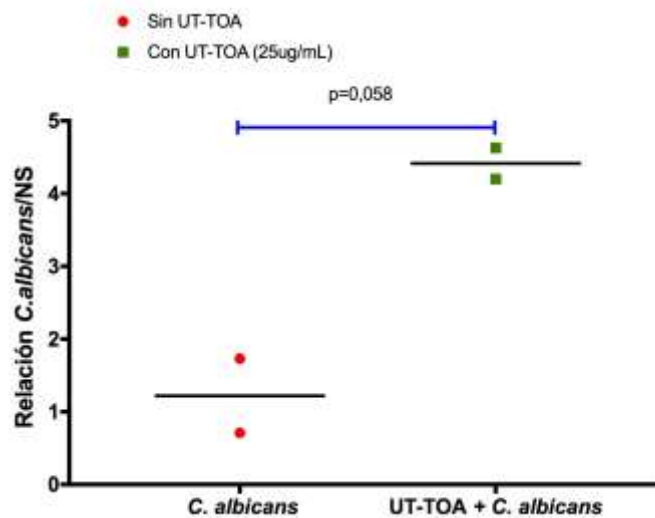


**Figura 24. Producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA (25 y 100ug/mL).**

Las gráficas representan la relación de quimioluminiscencia del Estímulo con/sin UT-TOA vs NS de monocitos-macrófagos ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) de 02 o 03 donantes diferentes cada uno por triplicado previamente tratados o no por 24h (A-C) y 48h (D-F) con UT-TOA (25ug/mL y 100ug/mL) y estimulados o no inmediatamente antes de la medición de ROS con PMA (100nM) (A y D); ZNO(50ng/mL) (B y E) y fMLP(1uM) (C y F). ROS= Especies Reactivas del Oxígeno; UT-TOA(ug/mL)= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; NS= Sin estímulo; PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetate; ZNO = Zymosan; fMLP = *N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar. ANOVA ordinario de una vía y test pos hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Significancia estadística si  $p < 0,05^*$ .

### 5.5. Producción de ROS frente a estímulo con *Candida albicans*

Luego del enfrentamiento por 24h de triplicados de monocitos-macrófagos en cultivo de 02 muestras independientes con *C. albicans* (relación 1:3) se observó que con el tratamiento de UT-TOA a 25ug/mL existió una tendencia que no fue estadísticamente significativa ( $p=0,058$ ) al incremento de la producción de ROS comparado con el grupo control sin UT-TOA (Figura 25).



**Figura 25. Producción de ROS en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA y estimulados con *C. albicans***

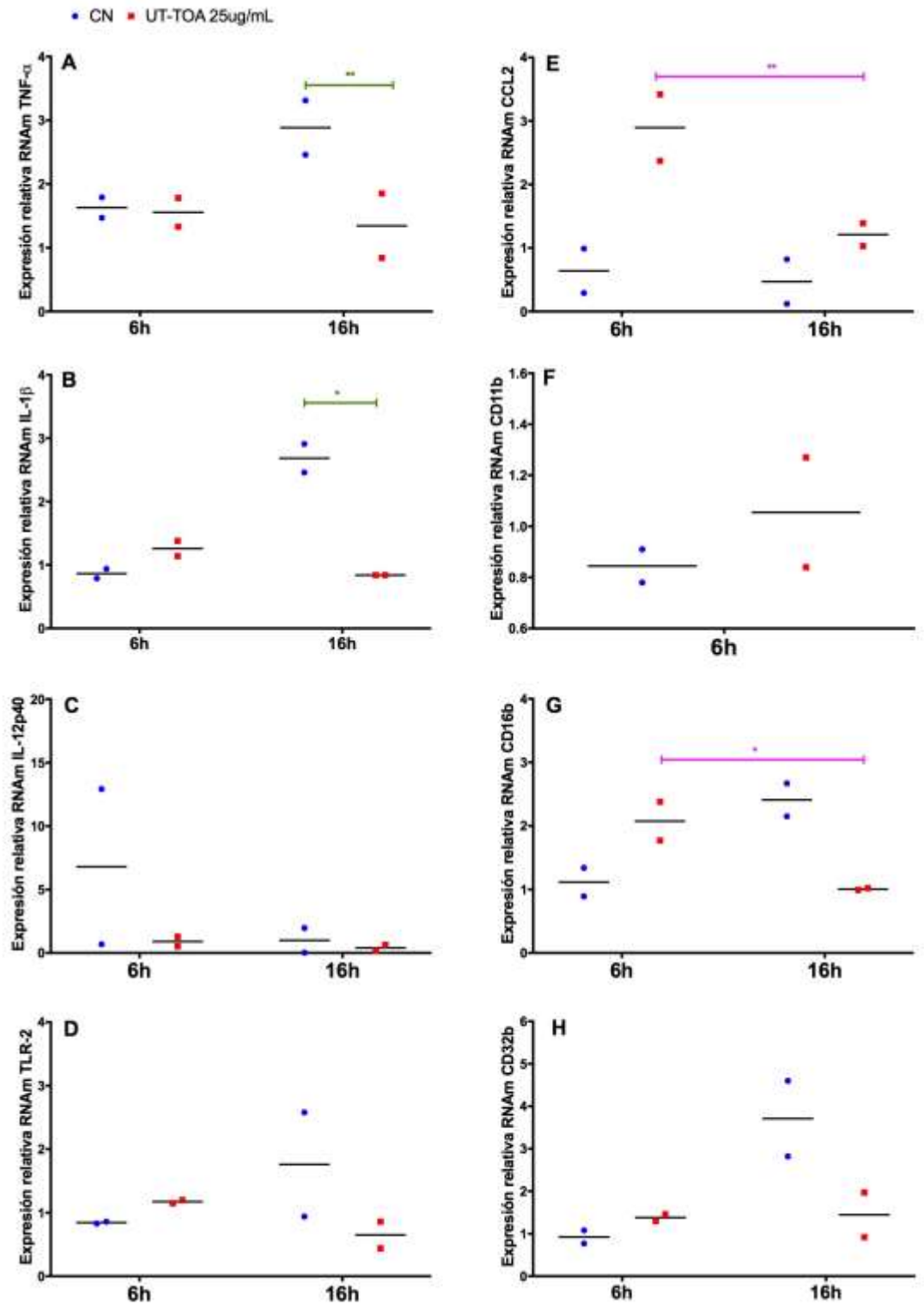
Las gráficas representan el promedio del triplicado de la relación de quimioluminiscencia del estímulo por *C. albicans* vs NS de monocitos-macrófagos ( $0,15 \times 10^6$  células/pozo) de 02 donantes previamente tratados o no por 24h con UT-TOA (25ug/mL) y estimulados o no con *C. albicans* (relación 1:3) e inmediatamente después de la medición de ROS durante 1h30min. ROS= Especies Reactivas del Oxígeno; UT-TOA(ug/mL)= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; NS= Sin estímulo. Test-t pareado de dos vías e intervalo de confianza de 95%. Significancia estadística si  $p < 0,05^*$ .

### 5.6. Evaluación transcripcional de la polarización M1/M2

Mediante el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR) se midió la expresión relativa del RNA

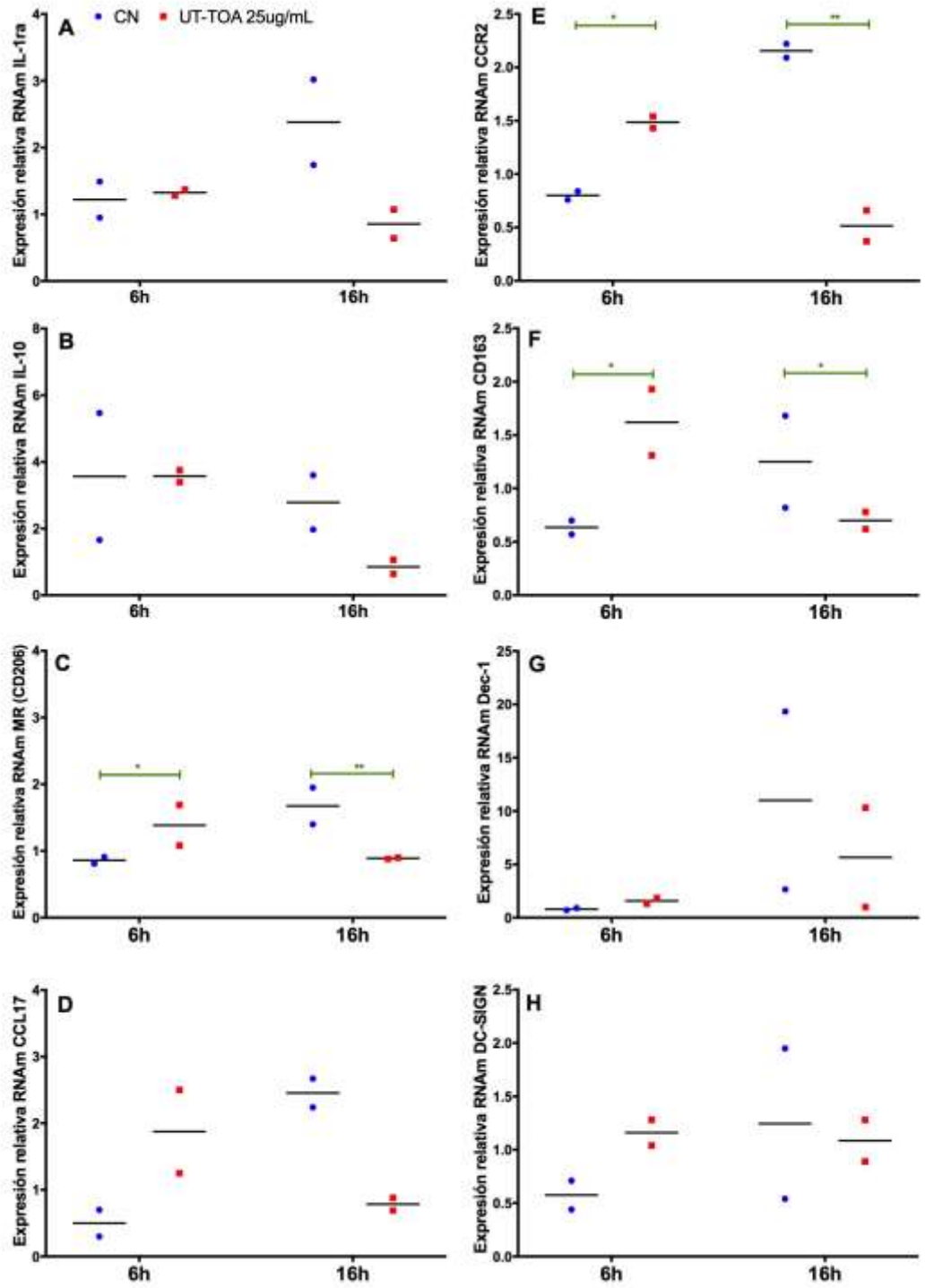
mensajero (RNAm) de genes relacionados con la polarización M1/M2 según Hao et al 2012 (113). En este caso se evaluaron 16 genes relacionados a citoquinas, quimioquinas y moléculas de superficie (principalmente receptores de reconocimiento). Se ensayaron 02 muestras independientes por triplicado y para cada una se evaluaron dos períodos de tratamiento con UT-TOA a la concentración final de 25ug/mL sobre la expresión de estos genes, tanto a las 6h como a las 16h de tratamiento. Comparando en todos los casos contra el grupo control negativo (CN, sin UT-TOA) (Fig. 26 y 27), los resultados demuestran que a las 6h de tratamiento, UT-TOA induce una tendencia al incremento ( $p>0,05$ ) de la expresión de los RNAm para *ccl2* y *cd16b*, es decir el 12,5% del total de marcadores M1/M2 (Fig. 26E y G). Asimismo, UT-TOA incrementa de manera significativa ( $p<0,05$ ) la expresión del RNAm del receptor de manosa (*mr* o *cd206*), *ccr2* y *cd163*, es decir el 18,75% del total de marcadores M1/M2 (Fig. 27C, E y F); mientras que la expresión relativa de los RNAm de *ccl17* y *dc-sign* mostraron una tendencia al incremento y representan el 12,5%. Adicionalmente, los resultados demuestran que a las 16h de tratamiento, UT-TOA disminuye significativamente ( $p<0,05$ ) la expresión relativa de los RNAm de *tnf- $\alpha$*  y *il-1 $\beta$* , es decir el 12,5% del total de marcadores M1/M2 (Fig. 26A y B); también hay una tendencia a disminuir la expresión relativa de los RNAm de *cd16b* y *cd32ab* (Fig. 26G y H) e incrementar el RNAm de *ccl2* (Fig. 26E) (estos marcadores representan el 12,5% y 6,25% de marcadores M1/M2, respectivamente). La evaluación estadística permitió determinar que la variable tiempo sólo

influyo en la expresión relativa de los RNAm de *ccl2* y *cd16b* (Fig.26 E y G), es decir en ambos casos el tratamiento con UT-TOA disminuye de manera significativa ( $p<0,05$ ) la expresión del RNAm de ambos marcadores conforme transcurre el tiempo. Por otro lado, durante las primeras 6h de tratamiento con UT-TOA se incrementa de manera significativa ( $p<0,05$ ) la expresión relativa de los RNAm de *mr o cd206*, *ccr2* y *cd163*, es decir el 18,75% del total de marcadores M1/M2 (Fig. 27C,E y F); mientras que se observo una tendencia al incremento de *ccl-17* y *dc-sign*, o sea el 12,5% de marcadores M1/M2 (Fig. 27D y H). Cuando se evalúa lo sucedido luego de 16h de tratamiento con UT-TOA se observó una disminución significativa ( $p<0,05$ ) de los mismos marcadores que fueron inducidos a las 6h, es decir, *mr o cd206*, *ccr2* y *cd163* (Fig. 27C,E y F) y de igual forma hubo una tendencia a la disminución de los marcadores *ccl-17* y *dc-sign* (Fig.27D y H).



**Figura 26. Expresión relativa del RNAm de genes relacionados a la polarización M1 de monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA.**

Se representa el promedio de la expresión relativa del RNAm de genes relacionados a la polarización M1 como una relación entre el valor que representa el RNAm del gen en estudio entre el RNAm del gen housekeeping o constitutivo de  $\beta$ -actina. Se usaron muestras triplicadas de 02 donantes de monocitos-macrófagos ( $0,45 \times 10^6$  células/pozo) tratados o no por 6h y 16h con UT-TOA (25ug/mL), las que fueron sometidas a la extracción del RNA total, transcripción reversa y qRT-PCR. □ rupo Control Negativo sin tratamiento (CN) ●; Grupo UT-TOA tratado con 25ug/mL del extracto ■. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, test de comparaciones múltiples por tratamiento y tiempo, test Pos Hoc de Sidak y significancia estadística si  $p < 0,05^*$  o  $p < 0,01^{**}$



**Figura 27. Expresión relativa del RNAm de genes relacionados a la polarización M2 de monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA.**

Se representa el promedio de la expresión relativa del RNAm de genes relacionados a la polarización M2 como una relación entre el valor que representa el RNAm del gen en estudio entre el RNAm del gen housekeeping o constitutivo de  $\beta$ -actina. Se usaron muestras triplicadas de 02 donantes de monocitos-macrófagos ( $0,45 \times 10^6$  células/pozo) tratados o no por 6h y 16h con UT-TOA (25ug/mL), las que fueron sometidas a la extracción del RNA total, transcripción reversa y qRT-PCR. □ grupo Control Negativo sin tratamiento (CN) ●; Grupo UT-TOA tratado con 25ug/mL del extracto ■. La expresión relativa se represento en promedio  $\pm$  error estándar de la media. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, test de comparaciones múltiples por tratamiento y tiempo, test Pos Hoc de Sidak y significancia estadística si  $p < 0,05^*$  o  $p < 0,01^{**}$

Considerando sólo la significancia estadística se diría que a nivel transcripcional UT-TOA induce una polarización M2 a las 6h de tratamiento (Fig.27C, E y F); mientras que si el tratamiento se prolonga hasta las 16h existiría una polarización mixta M1/M2 donde marcadores de ambos fenotipos disminuyen su expresión relativa (Fig. 26A y B y Fig. 27C, E y F). Lo anterior se puede apreciar en la Tabla 07 que resume el comportamiento de la expresión relativa de los RNAm en la polarización M1/M2.

**Tabla 7. Evaluación transcripcional de la polarización M1/M2 de monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA.**

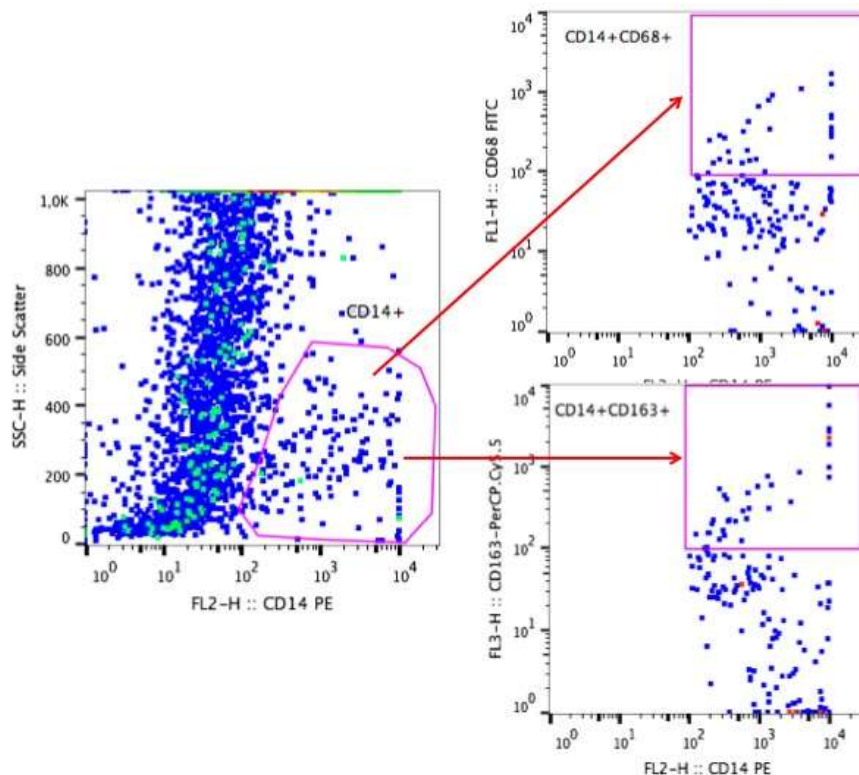
Se representa la expresión relativa del RNAm de genes relacionados a la polarización M1/M2. Se usaron 02 muestras por triplicado de monocitos-macrófagos ( $0,45 \times 10^6$  células/pozo) tratados o no por 6h y 16h con UT-TOA (25ug/mL), luego fueron sometidas a la extracción del RNA total, transcripción reversa y qRT-PCR. (+) expresión incrementada; (-) expresión disminuida; (=) expresión inalterada; **NO**= no se evaluó. Los incrementos o disminuciones tienen significancia estadística sólo si  $p < 0,05^*$ .

Función	GEN (RNAm)	Fenotipo		Muestras (n=02)	
		M1	M2	6h	16h
Citoquinas	<i>tnf-<math>\alpha</math></i>	+	-	=	- *
	<i>il-1<math>\alpha</math></i>	+	-	=	- *
	<i>il-1ra</i>	-	+	=	-
	<i>il-12p40</i>	+	-	=	=
	<i>il-10</i>	-	+	=	-
	<i>ccl-2</i>	+	-	+	+
	<i>ccl-17</i>	-	+	+	-
Receptor de CCL2	<i>ccr2</i>	-	+	+ *	- *
Receptor Lectinas tipo C	<i>mr</i>	-	+	+ *	- *
	<i>dec-1</i>	-	+	=	=
	<i>dc-sign</i>	-	+	+	=
Receptor de tipo Toll	<i>tlr-2</i>	+	-	=	=
Receptor scavenger	<i>cd163</i>	-	+	+ *	- *
Integrina	<i>cd11b</i>	+	-	=	<b>NO</b>
Receptor Fc (IgG)	<i>cd16b</i>	+	-	+	-
	<i>cd32ab</i>	+	-	=	-

## 5.7. Evaluación de los receptores de superficie de monocitos-macrófagos

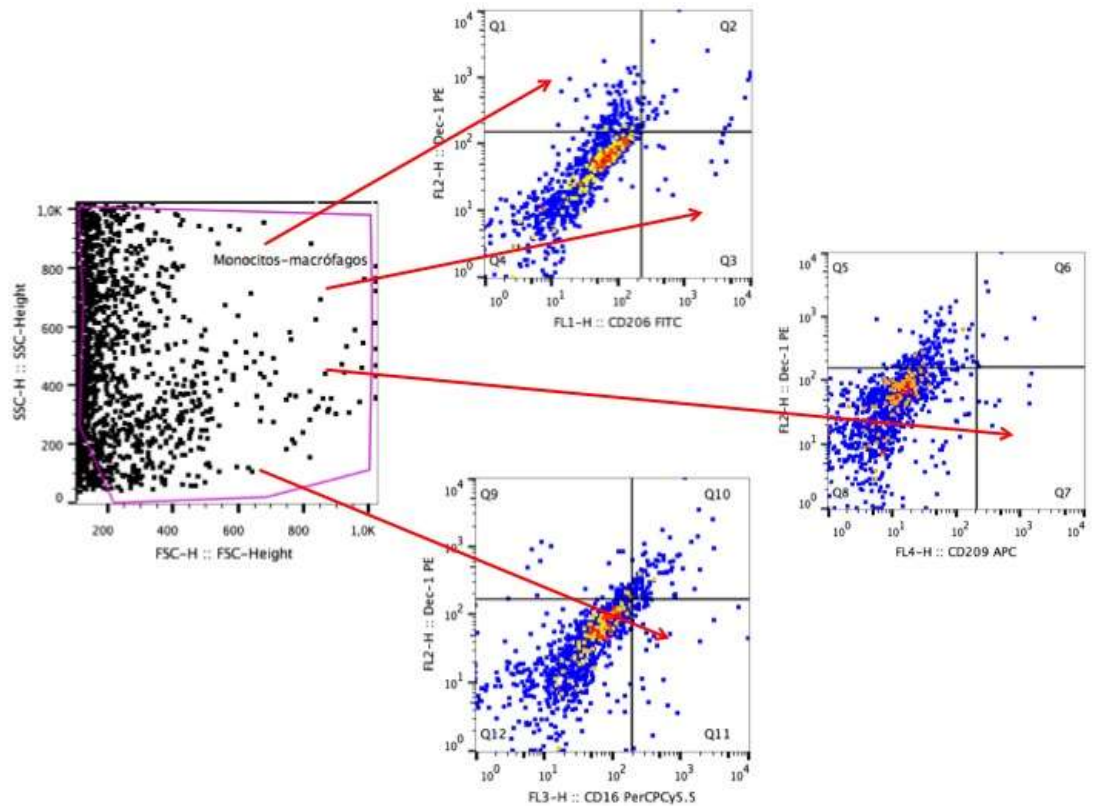
De los receptores implicados en la polarización M1/M2 a nivel transcripcional ha sido posible medir la expresión como receptor en la superficie de monocitos-macrófagos los siguientes: CD68 y CD16b (fenotipo M1) y CD163, receptor de manosa (MR) o CD206, Dec-1 y DC-SIGN o CD209 (fenotipo M2).

Se analizaron las muestras provenientes de 05 sujetos cuyos monocitos-macrófagos fueron tratados o no con 25ug/mL de UT-TOA durante 24h y se les realizó la citometría de flujo para los marcadores de superficie antes mencionados (ver Estrategia de citometría de flujo en Fig. 28 y 29).



**Figura 28.** Estrategia de citometría de flujo para la determinación de marcadores M1/M2. Las poblaciones se definieron en base a controles no marcados para establecer los límites de los cuadrantes, las poblaciones de interés se indican en las flechas.

Los monocitos-macrófagos obtenidos luego del tratamiento con UT-TOA (25ug/mL) durante 24h fueron marcados con anticuerpos monoclonales específicos para marcadores M1 (CD68) y M2 (CD163). El análisis consistió en determinar la población de monocitos-macrófagos por granularidad y expresión del marcador típico de monocitos-macrófagos CD14<sup>+</sup> (SSC vs CD14). A partir de esta selección se analizaron en gráficas dot plot de dos marcadores que representaban los porcentajes de poblaciones CD14<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (M1) y CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> (M2).

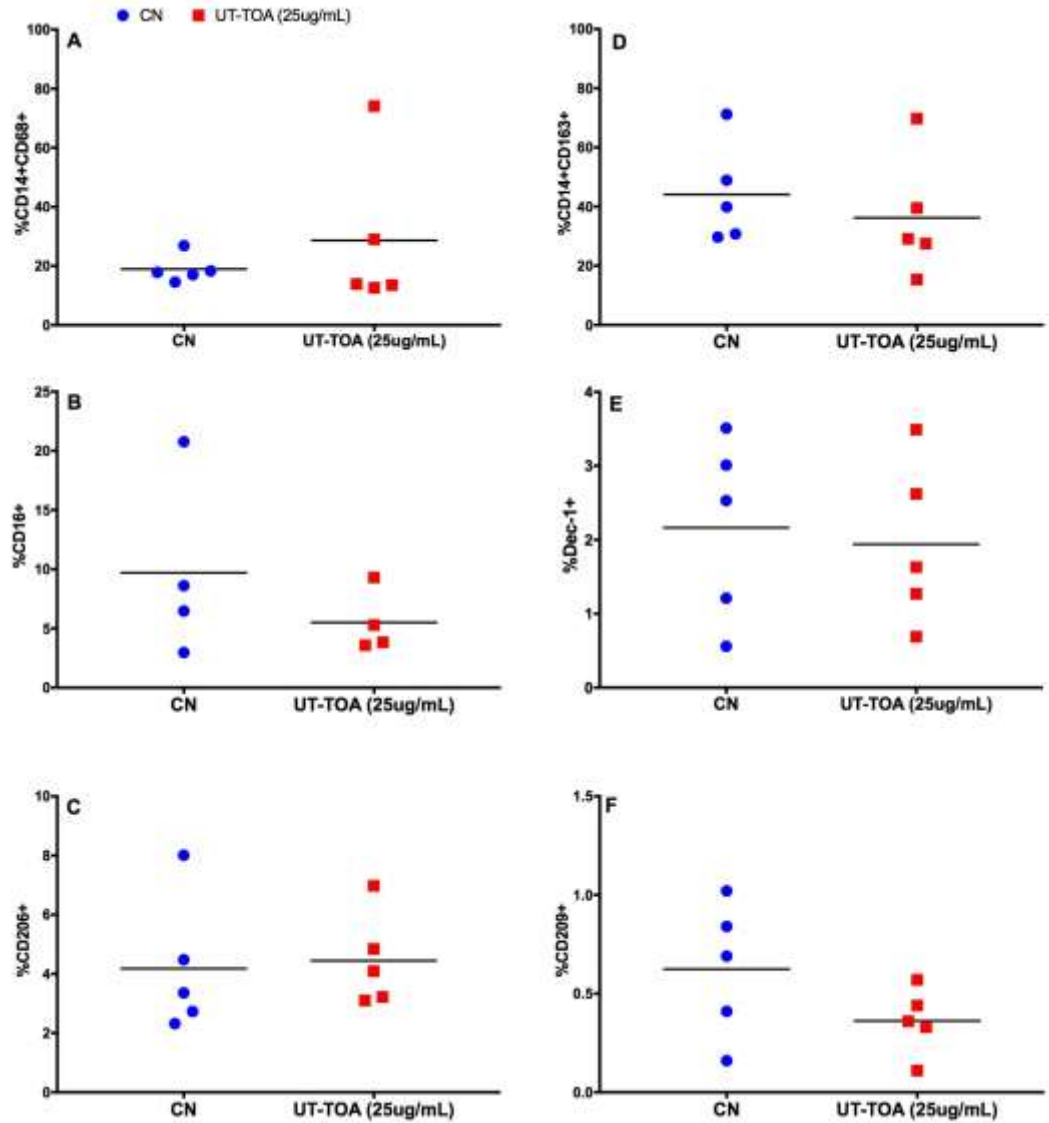


**Figura 29. Estrategia de citometría de flujo para la determinación de marcadores M1/M2.**

Los monocitos-macrófagos obtenidos luego del tratamiento con UT-TOA (25ug/mL) durante 24h fueron marcados con anticuerpos monoclonales específicos para marcadores M1 (CD16) y M2 (Dec-1, CD206 o receptor de manosa, CD209 o DC-SIGN). El análisis consistió en determinar la población de monocitos-macrófagos por tamaño y granularidad (FSC vs SSC). A partir de esta selección se analizaron en gráficas de cuadrantes los porcentajes de Dec-1<sup>+</sup> (cuadrante Q1); CD206<sup>+</sup> (cuadrante Q3); CD209<sup>+</sup> (cuadrante Q7) y CD16<sup>+</sup> (cuadrante Q11).

Los resultados demuestran que no hay variación en la expresión de los marcadores M1: CD68 y CD16 y M2: Dec-1, receptor de manosa o CD206 y DC-SIGN o CD209; sin embargo ambos tipos de marcadores están presentes en los monocitos-macrófagos tratados por lo que existiría

una polarización mixta que se mantiene independientemente del tratamiento con UT-TOA (Fig. 30).



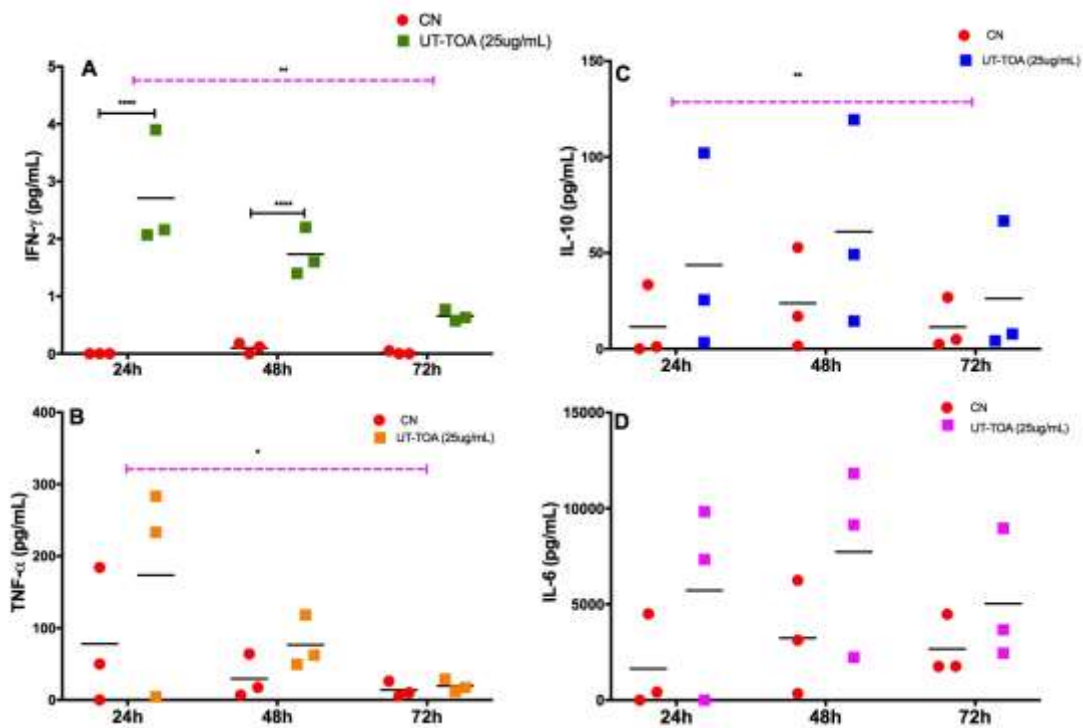
**Figura 30. Polarización M1/M2 de monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA.**

Se representa el porcentaje promedio de células CD14<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup> (M1) y CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>; Dec-1<sup>+</sup>; CD206<sup>+</sup> y CD209<sup>+</sup> (M2). Se usaron 05 muestras por triplicado de monocitos-macrófagos (0,15x10<sup>6</sup> células/pozo) tratados o no por 24h con UT-TOA (25ug/mL). La suspensión celular obtenida fue marcada con anticuerpos específicos. □□= □rupu Control Negativo, **UT-TOA**= Grupo tratado con 25ug/mL de extracto. ANOVA ordinario de dos vías, test de comparaciones múltiples, test Pos Hoc de Sidak y significancia estadística si p<0,05\*

### **5.8. Evaluación de citoquinas inmunomoduladoras**

Las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-10 fueron evaluadas todas al mismo tiempo en experimentos independientes a partir de muestras de sobrenadante de cultivo de monocitos-macrófagos de 03 donantes diferentes. Los sobrenadantes por triplicado de cada uno de estos donantes fueron obtenidos luego del tratamiento o no con 25ug/mL de UT-TOA durante 24h, 48h y 72h. Las concentraciones de citoquinas (pg/mL) fueron obtenidas a partir de la extrapolación del valor de intensidad de fluorescencia media de cada citoquina a curvas estándar. Las curvas guardaron la linealidad esperada con un  $R^2$  promedio de 99,95% (Anexo 03).

Los resultados demuestran que UT-TOA (25ug/mL) es capaz de incrementar de manera estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) la producción de IFN- $\gamma$  durante las primeras 24h y 48h (Fig.31A); sin embargo las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6 entre las 24h y 72h sólo mostraron tendencias al incremento en su concentración luego del tratamiento con UT-TOA (Fig.31B,C y D). Es importante destacar que luego de el tratamiento con UT-TOA la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y IL-10 disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) pero en función del factor tiempo de tratamiento (Fig.31B,C y D).



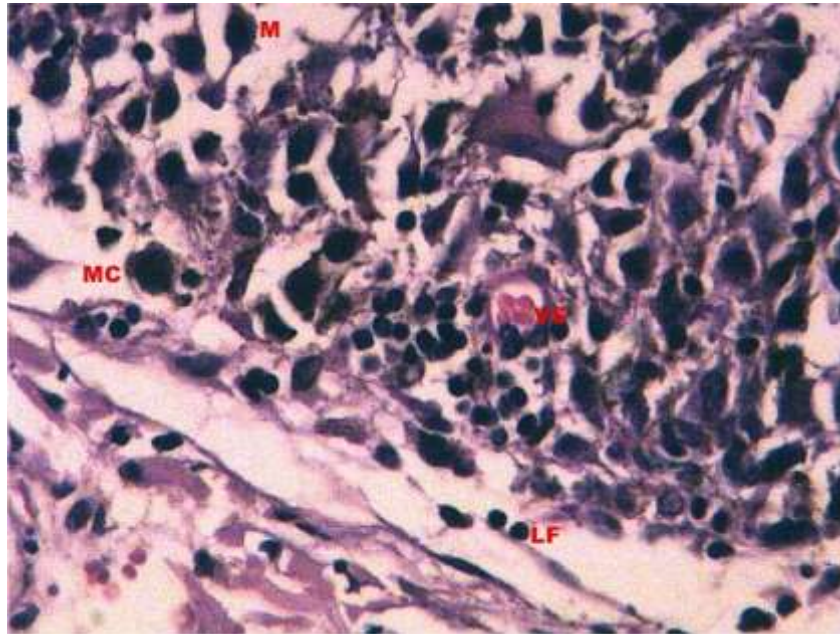
**Figura 31** Cinética de citoquinas inmunomoduladoras producidas por monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA.

Se sembraron monocitos-macrófagos ( $0,15 \times 10^6$  Cél/pozo) de 03 donantes independientes y se trataron o no con UT-TOA (25ug/mL) durante 24, 48 y 72h, luego se recogieron los sobrenadantes de cultivo para la medición de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-10 mediante citometría de flujo y su aplicación CBA. Cada punto en la gráfica representa la concentración promedio de citoquinas (pg/mL) de cada uno de los 03 donantes. **UT-TOA(ug/mL)**= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales; ANOVA de dos vías con medidas repetidas, test de comparaciones múltiples para los factores tratamiento y tiempo, test Pos Hoc de Sidak y significancia estadística si  $p < 0,05^*$  o  $p < 0,01^{**}$

### 5.9. Relación CD4+/CD8a+ y activación linfocitaria en ratones con melanoma tratados con UT-TOA

En ese estudio, se utilizaron dos tipos de muestras celulares mononucleares provenientes de sangre periférica (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) y del microambiente tumoral de melanoma (MTMC= microenvironment tumoral mononuclear cells). Ambas muestras son importantes ya que si bien es cierto las células inmunocompetentes en circulación pueden encontrarse maduras o inmaduras es altamente probable

que sean atraídas al microambiente tumoral debido no solo a la angiogénesis promovida por el tumor sino también al sistema de quimioquinas y sus receptores que permiten su llegada o "homing" hacia el microambiente tumoral como se evidencio en un corte histológico del tumor de melanoma (Fig. 32) (114).

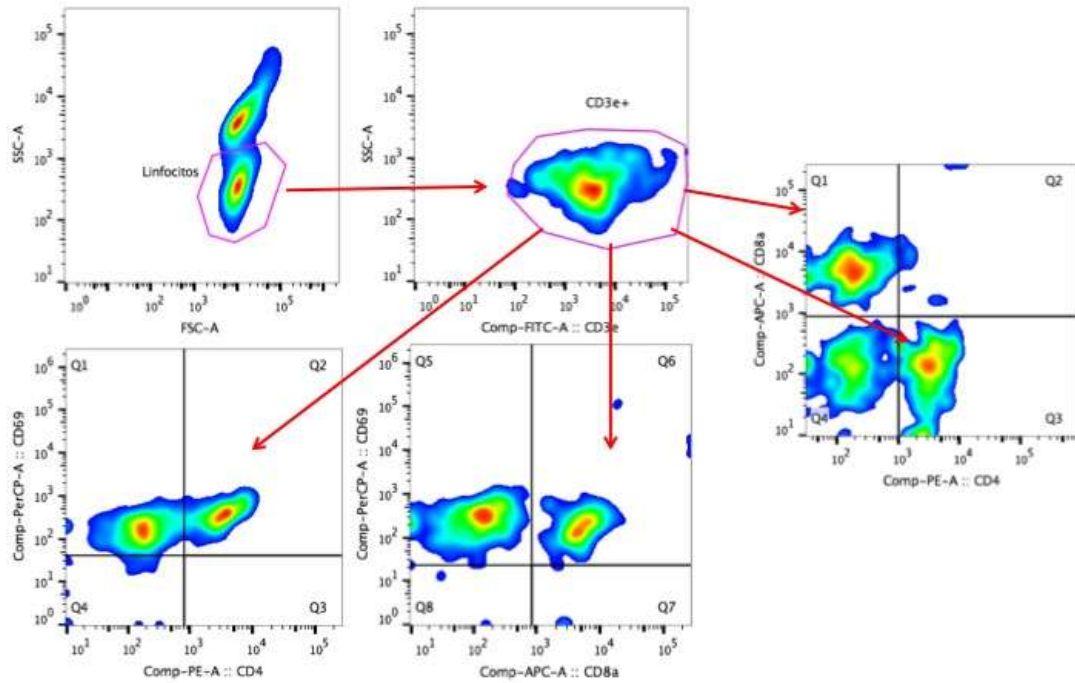


**Figura 32. Poblaciones inmunocompetentes en el microambiente tumoral.**

Corte histológico (hematoxilina-eosina) representativo de un tumor sólido de melanoma de un ratón del grupo que recibió 1000 mg/kg de UT-TOA (Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales). Microscopia de luz invertida, aumento 40x. **LF**= linfocitos; **M**=melanocitos; **MC**=macrófagos; **VS**=vasos sanguíneos con glóbulos rojos.

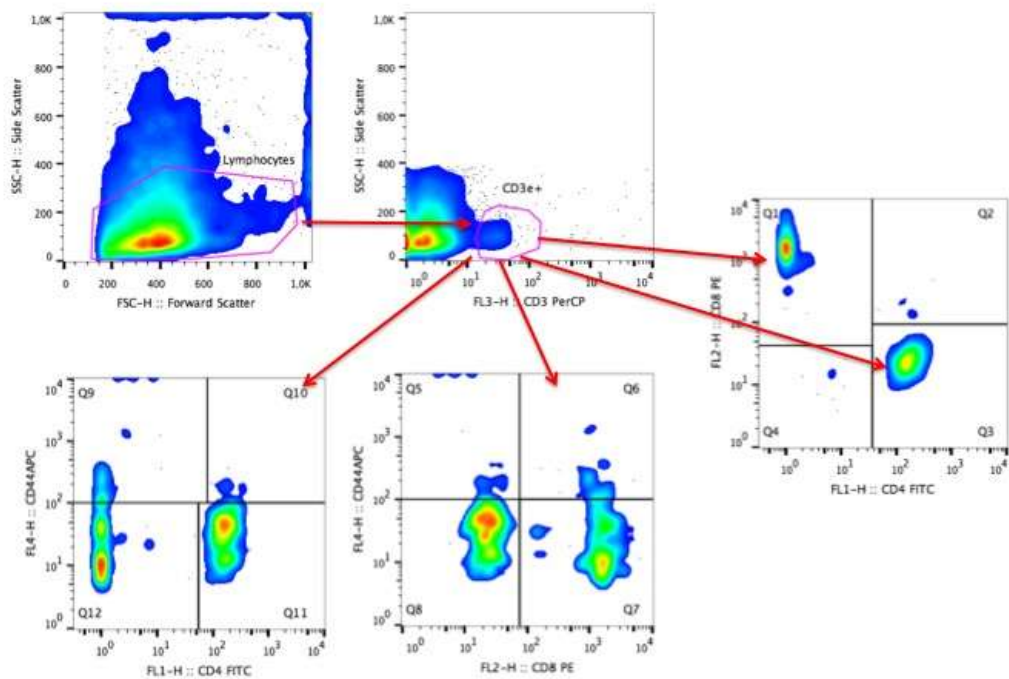
En ambos casos se determino primero el porcentaje de LT helper  $CD3e^+CD4^+$  y LT citotóxicos  $CD3e^+CD8^+$  y luego se cálculo la relación de  $CD4^+/CD8a^+$  (Ayudadores/Citotóxicos). Además, se determinó el nivel de activación representado por la expresión de los marcadores  $CD44^+$  en el caso de PBMC y  $CD69^+$  en MTMC. La determinación de estas poblaciones

se realizó siguiendo las siguientes estrategias por citometría de flujo. (Fig. 33 y 34).



**Figura 33. Estrategia de citometría de flujo para la determinación de LT a partir de MTMC.**

Las MTMC fueron obtenidas del tumor sólido de melanoma de ratones tratados con UT-TOA. Las células de fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos para LT helper (CD3e+CD4+) y citotóxicos (CD3e+CD8a+), mientras que el nivel de activación en cada uno fue medido por la expresión de CD69. El análisis consistió en determinar la población de linfocitos por tamaño y granularidad (FSC vs SSC). A partir de esta selección se obtuvo la población de LT (CD3e+) para luego obtener en gráficas de cuadrantes los porcentajes de LT no activados CD8a+ (cuadrante Q1); CD4+(cuadrante Q3); LT activados CD4+CD69+ (cuadrante Q2); CD8a+CD69+ (cuadrante Q6). **MTMC**= Células mononucleares del microambiente tumoral; **LT**= Linfocitos T.

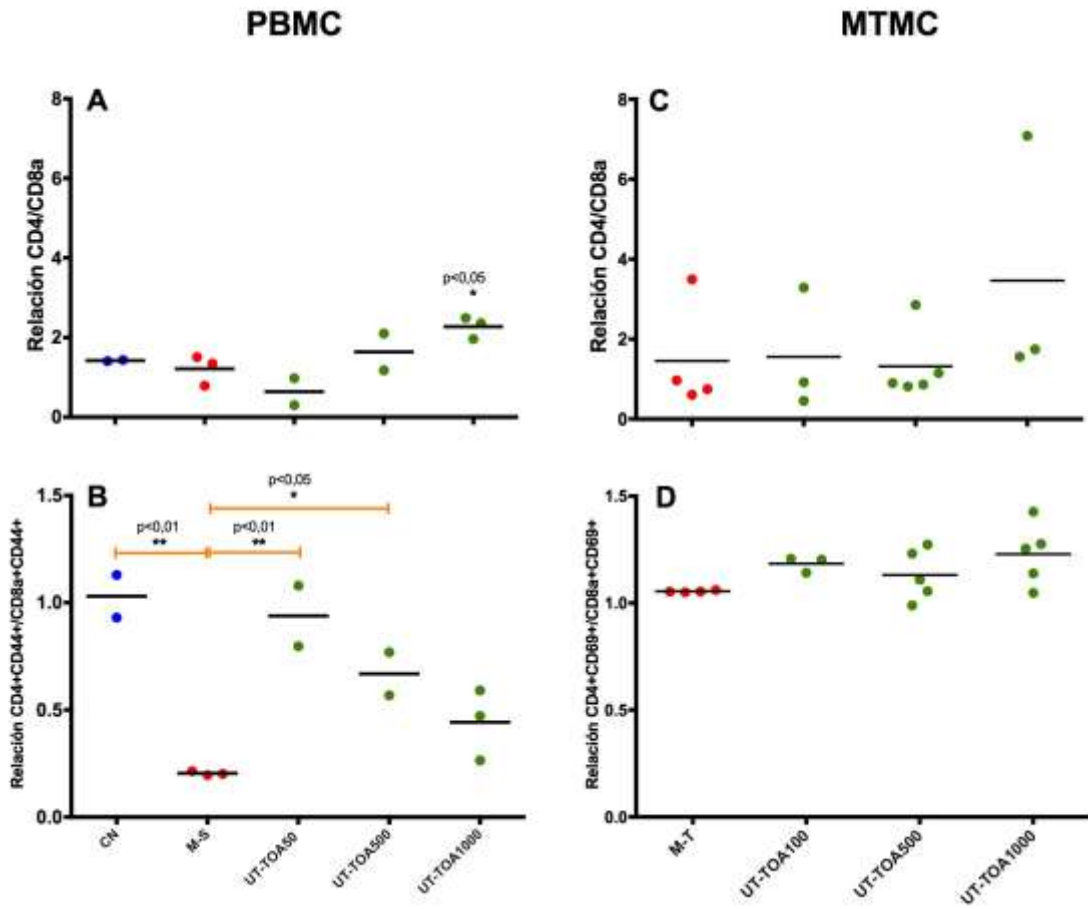


**Figura 34 Estrategia de citometría de flujo para la determinación de LT a partir de PBMC**

Las PBMC fueron obtenidas de sangre periférica de ratones tratados con UT-TOA. Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos para LT helper (CD3e+CD4+) y citotóxicos (CD3e+CD8a+), mientras que el nivel de activación en cada uno fue medido por la expresión de CD44. El análisis consistió en determinar la población de linfocitos por tamaño y granularidad (FSC vs SSC). A partir de esta selección se obtuvo la población de LT (CD3e+) para luego obtener en gráficas de cuadrantes los porcentajes de LT no activados CD8a+ (cuadrante Q1); CD4+(cuadrante Q3); LT activados CD4+CD44+ (cuadrante Q10); CD8a+CD44+ (cuadrante Q6). **PBMC**= Células mononucleares sangre periférica; **LT**= Linfocitos T.

Los resultados demuestran que no existen diferencias de la relación  $CD4^+/CD8a^+$  entre ratones sanos (CN) y ratones con melanoma (M-S) a nivel sistémico y en el microambiente tumoral (M-T), es decir la cantidad porcentual de linfocitos T es la misma y no es afectada por el tumor (Fig.35A y C); sin embargo, el tratamiento con UT-TOA mejora significativamente esta relación a nivel sistémico, la cual se incrementa de manera significativa ( $p < 0,05$ ) a la concentración de 1000mg/kg, es decir,

UT-TOA favorecería el incremento de linfocitos T helper (CD4+) vírgenes en circulación (Fig.35A). Cuando se evaluó el nivel de activación se observó que a diferencia del CN, el control M-S demostró una muy baja relación entre linfocitos T activados  $CD4^+CD44^+/CD8a^+CD44^+$  (Fig. 35B), lo que indicaría que el tumor estaría afectando la capacidad de activación que puede ejercer el LT helper  $CD4^+$  o LT citotóxico  $CD8a^+$ , existiendo más bien un problema funcional que de frecuencia o cantidad de linfocitos. Cuando se evaluó el tratamiento con UT-TOA, se demuestra que el nivel de activación a nivel sistémico se mejora significativamente ( $p<0,05$ ) a las dosis de 50 y 500mg/kg y aunque a la dosis de 1000mg/kg hay una tendencia a ser superior a la del control M-S, esta no llega a hacer significativa (Fig. 35B). Asimismo, la evaluación estadística demuestra que en el microambiente tumoral, UT-TOA no tuvo ningún efecto significativo sobre los parámetros anteriormente evaluados (Fig. 35 C y D).

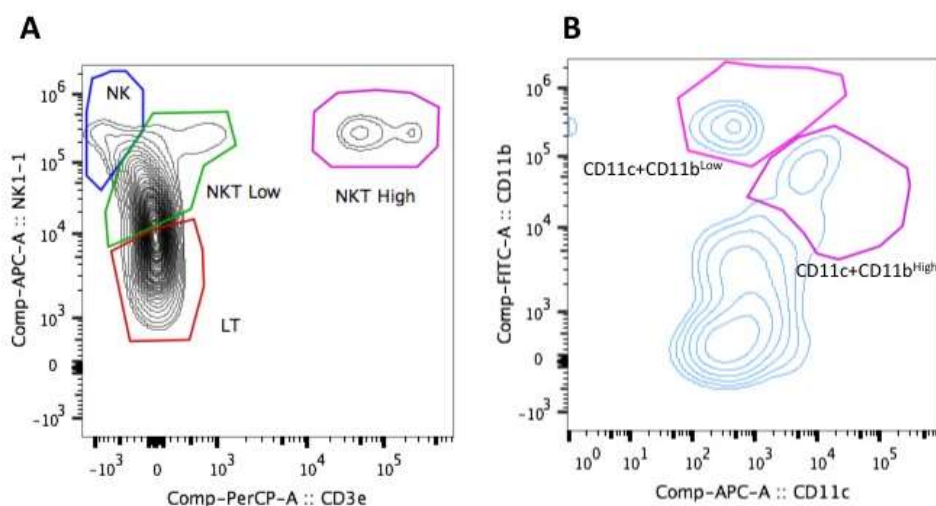


**Figura 35. Relación de linfocitos T sistémicos y del microambiente tumoral.**

Se determino por citometría de flujo los porcentajes de LT helper (CD3e+CD4+), LT citotóxicos (CD3e+CD8a+) y el nivel de activación (CD44+ o CD69+) de ambas poblaciones provenientes de PBMC o MTMC. Luego se determino y graficó las relaciones CD4+/CD8a+ (A,C) y CD4+CD44+/CD8a+CD44+ (B) o CD4+CD69+/CD8a+CD69+ (D) tanto para PBMC (A y B) como para MTMC (C y D), respectivamente. Las gráficas representan los porcentajes promedio 2 a 3 pools de muestras de sangre o el tumor individual de animales con y/o sin melanoma y tratados con dosis de 50 – 1000mg/kg de UT-TOA. **PBMC**=Células mononucleares de sangre periférica; **MTMC**= Células mononucleares del microambiente tumoral; **UT-TOA**= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales; **CN**= Control negativo sin melanoma; **M-S**= Control con melanoma y sin UT-TOA para sangre; **M-T**= Control con melanoma y sin UT-TOA para tumor subcutáneo. ANOVA ordinario de una vía y test de comparaciones múltiples. Significancia estadística si  $p < 0,05$ \* o  $p < 0,01$ \*\*

### 5.10. Evaluación de otras poblaciones inmunocompetentes en el microambiente tumoral de ratones con melanoma tratados con UT-TOA

En el presente estudio solo ha sido posible evaluar en el microambiente tumoral poblaciones inmunocompetentes como LT totales (CD3e+), linfocitos NK (NK1.1+CD3e-), NKT (NK1.1+CD3e+) y células dendríticas mieloides (DCm, CD11c+CD11b<sup>brigh</sup>) y plasmacitoides (DCp, CD11b+CD11b<sup>Low/-</sup>) luego del tratamiento o no con UT-TOA (100, 500 y 1000mg/kg). A continuación se muestra la estrategia de citometría de flujo para la determinación de las poblaciones inmunocompetentes en el microambiente tumoral (Figura 36). En el caso de linfocitos se tomo en cuenta el análisis sugerido por el fabricante BD Biosciences ([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com) Catalogo 550627) y en el caso de células dendríticas el recomendado por Den Haan JMM et al (115).



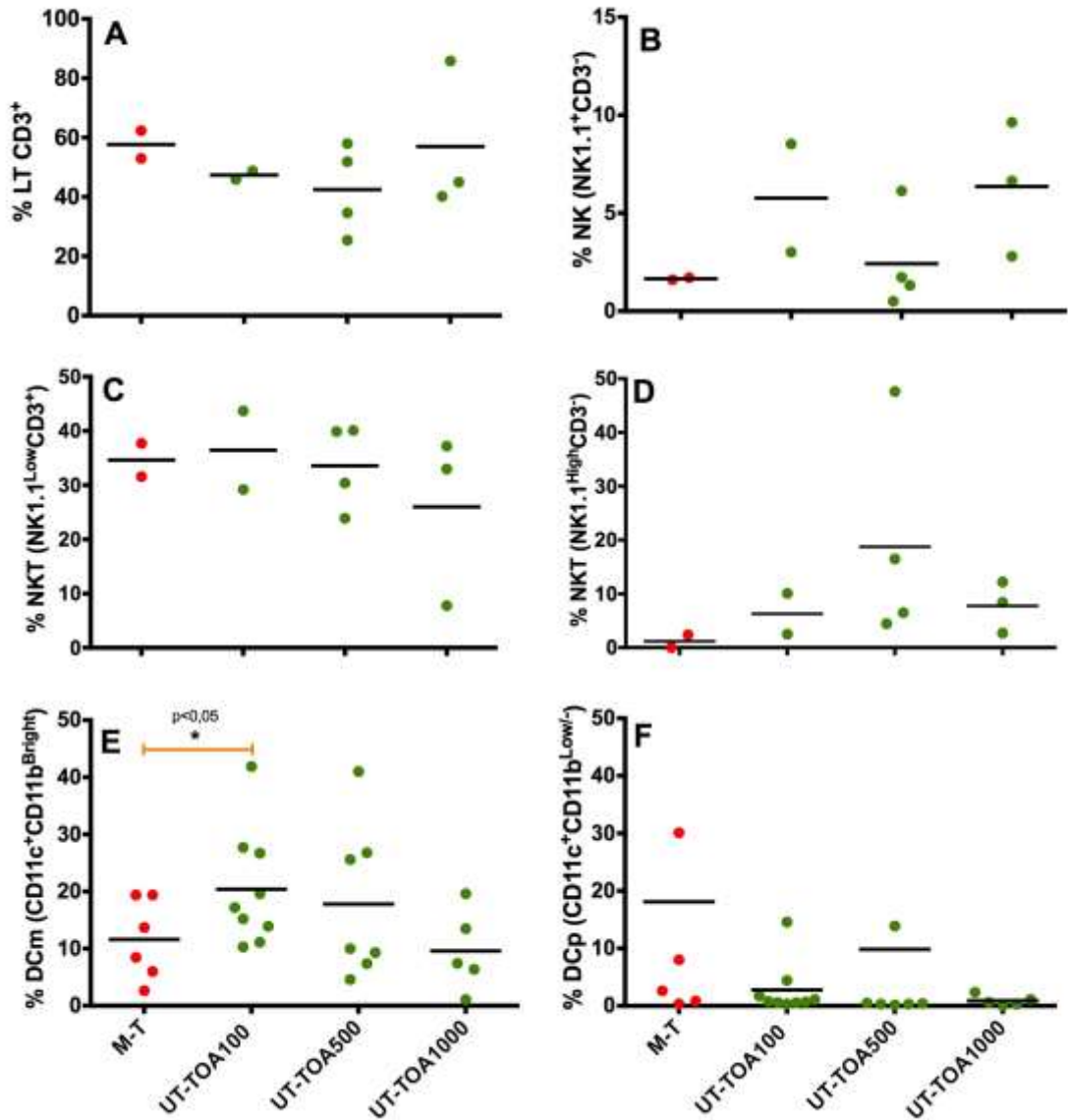
**Figura 36. Estrategia de citometría de flujo para la determinación de LT, NK, NKT y células dendríticas a partir de MTMC.**

Las MTMC fueron obtenidas del tumor sólido de melanoma de ratones tratados con UT-TOA. Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos para LT totales (CD3e+); linfocitos NK (NK.1.1+CD3e-) y NKT (NK1.1<sup>Low/High</sup>CD3e+) (A) y para células dendríticas mieloides (DCm,

CD11c+CD11b<sup>High</sup>) y plasmacitoides (DCp, CD11c+CD11b<sup>Low/</sup>) (**B**). El análisis con gráficas de contorno es representativa de una muestra y consistió en determinar primero la población de linfocitos y monocitos por tamaño y granularidad (FSC vs SSC), respectivamente. A partir de esta selección se obtuvo las poblaciones en **A** y **B**. Se puede apreciar en (**A**) que las poblaciones se acercan al eje X pero no por un problema de compensación sino por falta de ajuste de los voltajes de los canales de los respectivos fluorocromos en X e Y.

Los resultados demostraron que a nivel del microambiente tumoral el tratamiento con 100 mg/kg de UT-TOA logro incrementar de manera significativa ( $p < 0,05$ ) el porcentaje de células dendríticas mieloides (DCm) y que este incremento tendió a disminuir de manera dosis dependiente (Fig. 37E). Por otro lado, las poblaciones de LT, NK y NKT totales, así como la población de células dendríticas plasmacitoides no fueron afectadas por el tratamiento con UT-TOA (Fig. 37 A-D, F).

## MTMC



**Figura 37. Porcentajes de poblaciones de linfocitos y células dendríticas en microambiente tumoral.**

Se determinó por citometría de flujo los porcentajes de LT totales (CD3e+), NK (NK.1.1+CD3e-) y NKT (NK1.1<sup>Low/High</sup>CD3e+) en tumores de 02 a 05 ratones (A-D) y para células dendríticas mieloides (DCm, CD11c+CD11b<sup>Bright</sup>) y plasmacitoides (DCp, CD11c+CD11b<sup>Low/-</sup>) de tumores de 05 a 09 ratones (E,F) en MTMC. Las gráficas representan los porcentajes de cada muestra y el promedio de muestras de animales con melanoma y tratados o no con dosis de 100 – 1000mg/kg de UT-TOA. **MTMC**= Células mononucleares del microambiente tumoral; **UT-TOA**= Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales; **CN**= Control negativo sin melanoma; **M-T**= Control con melanoma y sin UT-TOA para tumor subcutáneo. Test de Mann-Whitney de una cola. Significancia estadística si  $p < 0,05^*$

### **5.11. Citoquinas sistémicas y del microambiente tumoral de ratones con melanoma tratados con UT-TOA**

Tras la obtención de PBMC y MTMC estas células se mantuvieron en cultivo celular por no más de 24h al cabo de las cuales fue posible obtener los sobrenadantes de cultivo para proceder a la medición de citoquinas por una variante de la citometría de flujo, el ensayo de CBA con el que es posible medir moléculas solubles utilizando beads de captura y sobretodo medir múltiples citoquinas en una misma muestra de sobrenadante de cultivo.

Las citoquinas que se midieron en ambos tipos de muestras (PBMC y MTMC) fueron IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (citoquinas Th1) y IL-6, IL-10 (citoquinas Th2) (Fig. 38); mientras que IL-2 (Th1), IL-4 (Th2), IL-17A (Th17) se midieron sólo en PBMC y las citoquinas inflamatorias MCP-1 y IL-12p70 sólo se midieron en MTMC (Fig.39).

Los resultados demuestran que de las citoquinas evaluadas tanto a nivel sistémico como en el microambiente tumoral sólo la citoquina TNF- $\alpha$  una citoquina tipo Th1 se incremento de manera significativa ( $p < 0,05$ ) comparada contra el grupo M-T, luego del tratamiento con 1000mg/kg de UT-TOA (Fig. 38C); mientras que las demás citoquinas no fueron modificadas por el tratamiento con UT-TOA (Fig. 38).

Cuando se evaluó la producción de IL-17, una citoquina Th17, a nivel sistémico se encontró una disminución estadísticamente significativa comparada con el grupo M-T, luego del tratamiento con 1000mg/kg de UT-TOA (Fig. 39E); sin embargo, las citoquinas IL-2, IL-4 a nivel sistémico

(Fig. 39A y C) y MCP-1 y IL-12p70 a nivel del microambiente tumoral (Fig.39 B y D) no cambiaron su nivel de expresión luego del tratamiento con UT-TOA.

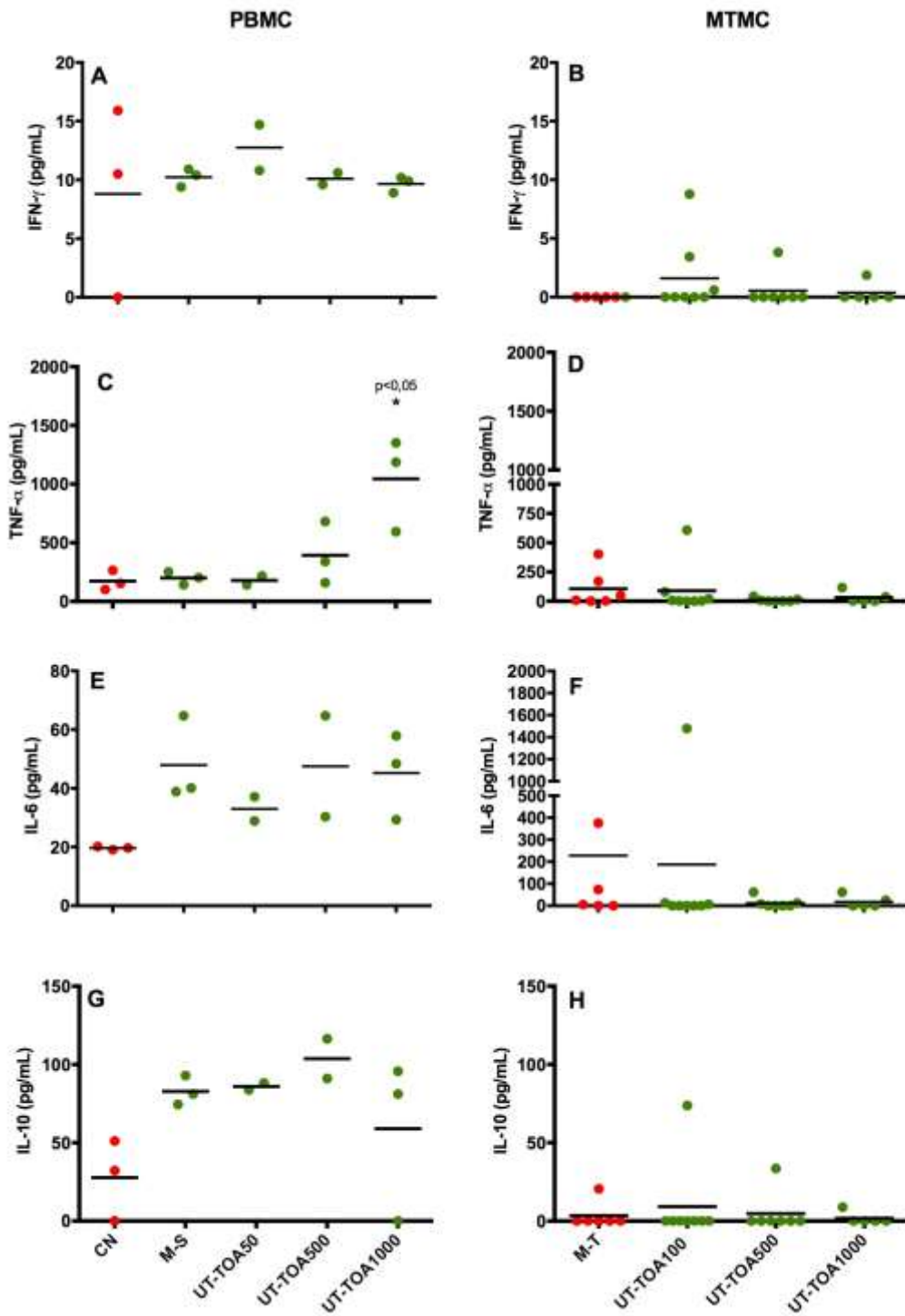
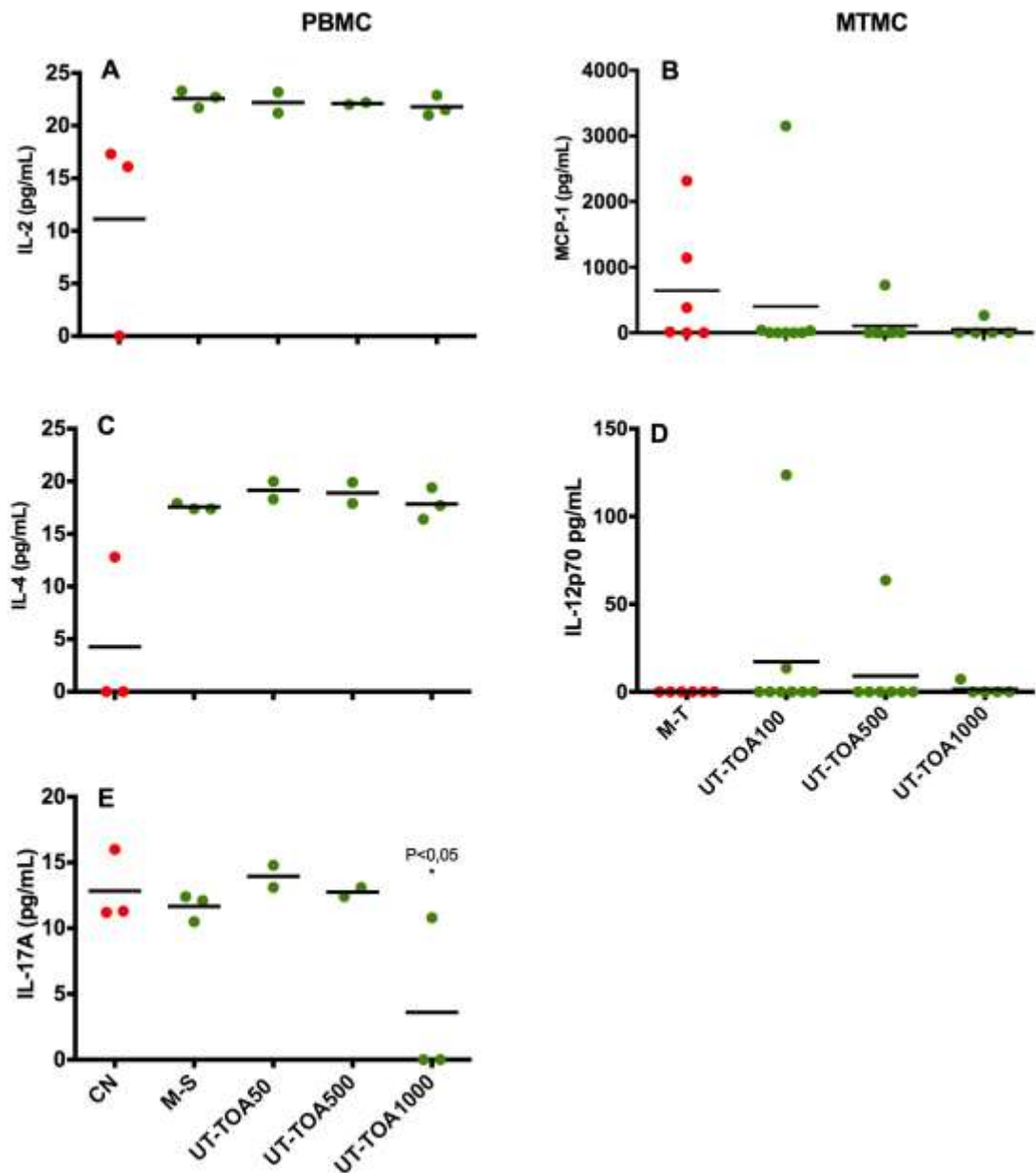


Figura 38. Niveles de citoquinas Th1/Th2 en PBMC y MTMC.

Se determino por citometría de flujo (CBA) la concentración (pg/mL) de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de PBMC y MTMC provenientes de ratones con o sin melanoma, tratados o no con UT-TOA (50 – 1000mg/kg). Las gráficas representan los niveles de citoquinas promedio de 2 a 3 pools de muestras de sangre o del tumor individual de animales. **MTMC**= células mononucleares del microambiente tumoral; **PBMC**= células mononucleares de sangre periférica; **UT-TOA**= extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales; **CN**= Control negativo sin melanoma; **M-S**= Control con melanoma y sin UT-TOA para sangre; **M-T**= Control con melanoma y sin UT-TOA para tumor subcutáneo. ANOVA ordinario de una cola y test pos hoc de Dunnett. Significancia estadística si  $p < 0,05^*$ .



**Figura 39. Niveles de citoquinas Th1/Th2/Th17 en PBMC e inflamatorias en MTMC.**

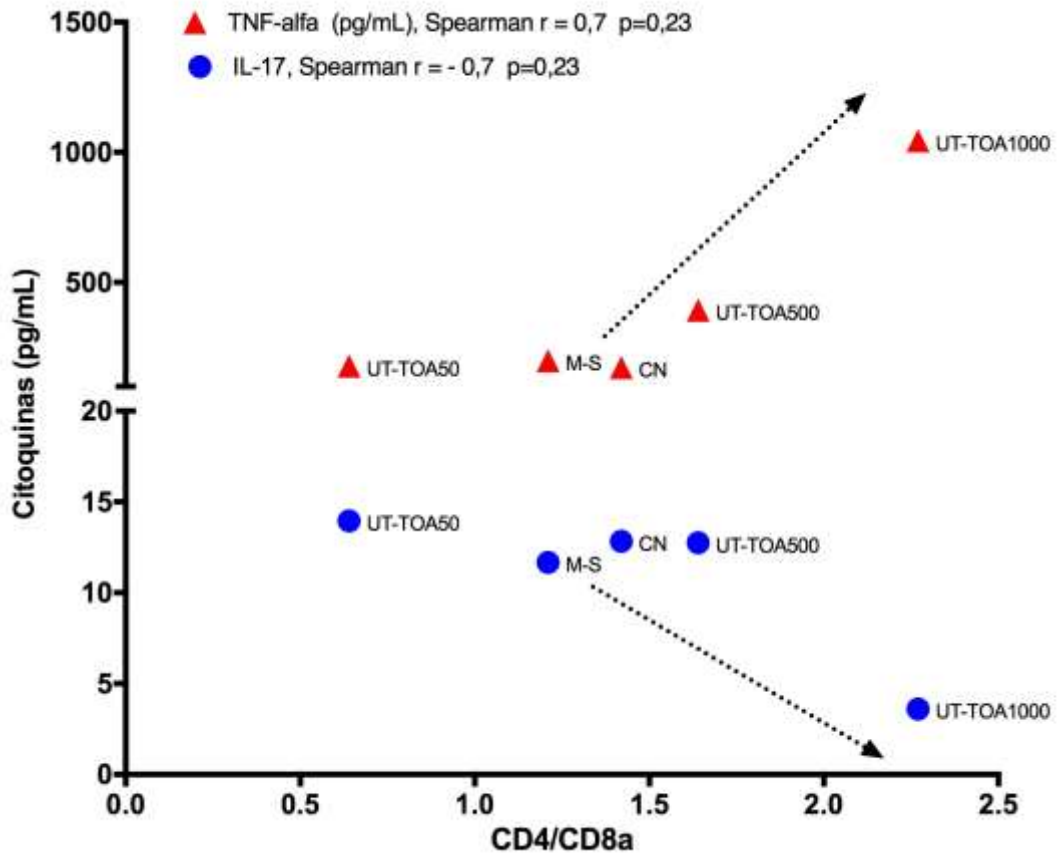
Se determino por citometría de flujo (CBA) la concentración (pg/mL) de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de PBMC y MTMC provenientes de ratones con o sin melanoma, tratados o no con UT-TOA (50 – 1000mg/kg). Las gráficas representan los niveles de citoquinas promedio de 2 a 3 pools de muestras de sangre o del tumor individual de animales. **MTMC**= células mononucleares del microambiente tumoral; **PBMC**= células mononucleares de sangre periférica;

**UT-TOA**= extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales; **CN**= Control negativo sin melanoma; **M-S**= Control con melanoma y sin UT-TOA para sangre; **M-T**= Control con melanoma y sin UT-TOA para tumor subcutáneo. ANOVA ordinario de una cola y test pos hoc de Dunnett. IL-17 sólo mostro significancia con el test-t no pareado de una cola. Significancia estadística si  $p < 0,05^*$  .

### **5.12. Correlación entre la relación de linfocitos CD4/CD8a y citoquinas sistémicas en ratones con melanoma tratados con UT-TOA**

Adicionalmente se hicieron correlaciones entre las distintas variables medidas en el estudio tanto para células como para citoquinas y entre ellas.

Al respecto, se encontró que en particular las citoquinas sistémicas TNF- $\alpha$  y IL17-A y la relación de linfocitos CD4/CD8a mantienen correlaciones positivas ( $r=0,7$ ) y negativas ( $r= -0,7$ ), respectivamente; sin embargo no se encontró significancia estadística por lo que se deben considerar como tendencias (Fig. 39).



**Figura 40. Correlación entre citoquinas y la relación de linfocitos CD4/CD8a.**

Se obtuvieron los valores promedio para TNF- $\alpha$  y IL-17 en unidades de pg/mL, las cuales fueron correlacionadas respectivamente con los valores de la relación de linfocitos CD4/CD8a para muestras provenientes de PBMC de ratones con o sin melanoma, tratados o no con UT-TOA (50 – 1000mg/kg). **PBMC**= células mononucleares de sangre periférica; **UT-TOA**= extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos totales. **CN**= Control negativo sin melanoma; **M-S**= Control con melanoma y sin UT-TOA para sangre. Correlación de Spearman ( $r$ ) de dos colas. Valores de  $r$  negativos o positivos significan correlaciones negativas o positivas entre citoquinas y la relación de linfocitos, respectivamente. Significancia estadística si  $p < 0,05^*$

## 6. DISCUSIÓN

La Uña de Gato o *Uncaria tomentosa* es una planta oriunda de la Amazonía peruana y ha sido usada por la medicina tradicional atribuyéndosele una serie de propiedades muchas de las cuales se han demostrado científicamente pero otras tantas sólo tienen una base empírica y deberán ser probadas. Por tanto, el principal objetivo de este estudio es la evaluación de la capacidad inmunoestimulante de un extracto de *Uncaria tomentosa*, para lo cual se han realizado dos diseños experimentales uno basado en el estudio de monocitos-macrófagos de sujetos humanos sanos y otro relacionado a un modelo murino de tumor sólido (melanoma murino) habiéndose evaluado en ambos casos el extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa*, el que contó como único marcador químico la determinación de los alcaloides oxindólicos totales (5,03%). En cuanto a la parte metodológica se ha tenido en cuenta el uso de células inmunocompetentes de sujetos humanos sanos y del modelo murino en quienes se han medido parámetros inmunológicos de la manera más natural posible, reduciendo a lo estrictamente necesario el uso de estímulos que normalmente no están presentes en una respuesta inmune convencional y en el caso de haberlos estos son declarados a lo largo de la discusión.

Los principales hallazgos con monocitos-macrófagos humanos demuestran que el extracto de UT-TOA es inocuo en un rango de concentraciones menores a los 100ug/mL, lo que conjuga con la idea que se tiene cuando se investigan productos naturales donde se espera que los efectos biológicos se den a concentraciones lo más bajas posibles para evitar posibles efectos

adversos sobre otros componentes y que exista una buena tolerabilidad sobretodo si serán recomendados como tratamientos alternativos (116). En este estudio la dosis de 25ug/mL demostró importantes efectos biológicos como el incremento de ROS o estallido respiratorio, lo que le podría otorgar una potencial capacidad de mejorar el proceso de eliminación de microorganismos patógenos como por ejemplo con *C. albicans*. A esta misma concentración y a nivel transcripcional se demostró que UT-TOA indujo una polarización que paso de M2 a una mixta M1/M2 dependiente del tiempo de tratamiento (6h y 16h) y a nivel proteomico la polarización se mantiene en un perfil mixto M1/M2 (24h) a pesar que sólo se evidencio el incremento de IFN- $\gamma$ , una citoquina relacionada a la polarización M1; sin embargo, se deja abierta la posibilidad de que otras concentraciones de UT-TOA puedan tener iguales o mejores efectos biológicos.

En cuanto al estudio de ratones con melanoma tratados con UT-TOA se demostró una mayor actividad a nivel sistémico que en el microambiente tumoral. A nivel sistémico existió un incremento de la relación de linfocitos T CD4/CD8a y una recuperación de la capacidad de activación de estas células. Además, la evaluación de la producción de citoquinas demostró un incremento de TNF- $\alpha$  y una disminución de IL-17A, ambas citoquinas muestran una tendencia a correlacionarse positiva y negativamente con la relación de linfocitos T CD4/CD8a, respectivamente. A nivel del microambiente tumoral el único parámetro inmunológico que demostró un incremento significativo fue el porcentaje poblacional de células dendríticas mieloides.

Existen muy pocos estudios que reporten los efectos de *Uncaria tomentosa* sobre subpoblaciones del linaje monocito-macrófago por tanto este estudio al igual que el de Monserrat-de la Paz S et al (117) constituyen una fuente importante de información para dilucidar, en distintos escenarios, la actividad inmunoestimulante de *U. tomentosa*. La mayoría de estudios incluyen el uso de estímulos (Por ej. LPS o lipopolisácaridos, citoquinas, etc.) que inducen una pre activación de los monocitos-macrófagos antes de evaluar al agente motivo de estudio. En particular, Monserrat-de la Paz S et al demostraron un cambio de la polarización M1 (inducida por LPS) a un fenotipo M2 luego del tratamiento con el alcaloide oxindólico pentacíclico Mitrafilina, el que fue aislado de la fracción alcaloide (0,1%) de un extracto de la corteza de *U. tomentosa* de origen peruano, resultado que se asemeja al del presente estudio pero a nivel transcripcional y durante las primeras 6h de tratamiento, aunque es importante recomendar que se incremente el número de muestras en evaluación para poder corroborar este resultado. Al respecto, la intención de esta investigación ha sido evaluar a los monocitos-macrófagos en su estado natural desde su obtención como células adherentes hasta su uso en ensayos in vitro, sin utilizar estímulos que alteren significativamente sus funciones como es el caso de LPS o citoquinas como IFN-gamma, los cuales suelen ser usados en estudios similares.

Como se mencionó en la sección de Material y Métodos, el extracto utilizado (UT-TOA) en este estudio fue preparado en el año 2010 y es perfectamente válido deducir que no sólo el contenido químico sino también la actividad biológica hayan podido disminuir a lo largo del tiempo. Al

respecto, Laus G et al (18) demostró que varias plantas de *Uncaria tomentosa* cosechadas en aproximadamente cada 2 años durante 4, 6 y 7 años presentaron patrones de alcaloides completamente distintos, pudiendo variar el contenido total de alcaloides de 0,036 a 3,83% (p/p); sin embargo, en todos los casos los isómeros de pteropodina, mitrafilina o rincofilina fueron siempre encontrados como los principales constituyentes. Si bien las plantas fueron recolectadas entre junio y octubre, existen reportes en plantas asiáticas como *Mitragyna parvifolia* en las que el cambio puede ser en varios meses. Asimismo, se han hecho estudios relacionados al clima y al efecto que pueden ejercer las temperaturas estacionales y las fluctuaciones a largo plazo y no se ha observado correlación con el contenido de alcaloides totales, por tanto se puede concluir únicamente que la distribución de alcaloides de las especies de *U. tomentosa* esta sujeta a cambios. Por otro lado, Navarro M et al en una especie de *U. tomentosa* de Costa Rica ha demostrado que el contenido de flavonoides en distintas partes de la planta como hojas, tallo, corteza y raíz es diferente siendo el contenido fenólico total mayor en hojas, tallos y corteza que en raíz, también se asocia a lo anterior el origen geográfico de la planta y el uso de solventes de baja o mediana polaridad para obtener fracciones fenólicas enriquecidas (2). Por lo tanto, lo anterior podría explicar la inconsistencia de los hallazgos en las diferentes investigaciones con esta planta y que los hallazgos obtenidos deben circunscribirse a un tipo particular de preparación del extracto utilizado. En nuestro caso, se puede concluir que a pesar de que hayan habido cambios en la composición química del extracto de UT-TOA por

efectos del tiempo, la actividad biológica del mismo aún se ha mantenido, lo que se demuestra no sólo a través de los resultados obtenidos sino también con los resultados de ensayos realizados en el 2014 y publicados en el 2015 (114). Adicionalmente, es importante recalcar que frente a este tipo de situaciones relacionadas con el tiempo de almacenamiento del extracto sería importante reanalizar el contenido de los metabolitos secundarios con fines de controlar no sólo la actividad química sino también la actividad biológica de este tipo de productos naturales. Por otro lado, aunque existen estudios que demuestran actividades biológicas de extractos libres o con trazas de alcaloides (20,118,119), no se puede descartar que los efectos encontrados sean o no debidos al contenido de alcaloides medidos en el extracto utilizado, en vista de que las preparaciones y conservaciones de los mismos pueden ser distintas y de que los metabolitos de esta planta tienen efectos sinérgicos (10).

Uno de los primeros aspectos a evaluar en el estudio de productos naturales y sobretodo de extractos de plantas, muchos de los cuales tienen distinta metodología para su preparación, es la actividad citotóxica o de inducción de muerte celular sobre los linajes celulares a ensayar y en particular sobre los monocitos-macrófagos humanos usados en este estudio.

Tomados juntos los resultados de evaluación de viabilidad, citotoxicidad y apoptosis celular se demostró que el extracto de UT-TOA no altera la viabilidad celular, no es citotóxico y no induce apoptosis en el rango de concentraciones de 6,25 – 100ug/mL por tanto efectos positivos como la actividad antioxidante encontrada por Dreifuss AA et al (41), quien utilizó

nuestro mismo extracto o los resultados descritos en esta investigación son debidos a la actividad biológica del extracto y no a la actividad citotóxica, la que se manifiesta a concentraciones superiores a 100ug/mL.

En este estudio la evaluación de la citotoxicidad inducida por UT-TOA luego de 24h de tratamiento ha sido abordado midiendo la pérdida de la integridad de la membrana por el ensayo de LDH y evaluando la función mitocondrial por el ensayo de MTT pero además un evento que no es medible directamente por estos ensayos es la inducción de apoptosis en el cual habiendo células viables es posible que estas estén iniciando un proceso de apoptosis, en el que la integridad de la membrana no se pierde pero si cambia morfológicamente (hinchamiento de la membrana) y en este caso los cambios más importantes ocurren a nivel intracelular y nuclear y son medibles con ensayos como el 7-AAD, ya que el ensayo de MTT no permite evaluar la apoptosis (120,121).

El ensayo de MTT demostró que la dosis inhibidora al 50% (IC50) del extracto de UT-TOA fue de 107,1ug/mL, es decir que hasta esta concentración al menos se mantenía la viabilidad del 50% de los monocitos-macrófagos evaluados. Es importante remarcar que en el ensayo de MTT en particular con el extracto de UT-TOA se observó un "efecto colorimétrico" debido a que la coloración violácea del compuesto formazan liberado por células no viables se superpone e incrementa su intensidad cuando se mezcla con la coloración natural de los pigmentos del extracto sobretodo a concentraciones altas (Fig.10). Este mismo efecto fue notado por Dreifuss AA, quien lo corrigió midiendo la absorbancia del extracto antes y después

de la aplicación del compuesto DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y haciendo la respectiva sustracción con lo que pudo medir la actividad antioxidante (20). Por lo tanto, es necesario correr paralelamente recipientes de cultivo sin células y con las mismas concentraciones del extracto de UT-TOA evaluadas para luego restar la absorbancia a los recipientes que contienen las células y el extracto de UT-TOA, ya que de lo contrario se obtendrán falsos resultados dosis-crecientes de incremento de la viabilidad celular (Fig.11) como ocurrió inicialmente y se corrigió posteriormente.

Cuando se evaluó la integridad de la membrana mediante la liberación de la enzima LDH se demostró que a partir de 100ug/mL existía un incremento significativo de la actividad de la LDH, es decir por debajo de esta dosis no existe efecto citotóxico (Fig.17). La medición de la actividad de la LDH se ha convertido en un excelente marcador predictor de la muerte celular de múltiples líneas celulares, habiéndose demostrado que cuando la viabilidad es del 100% no existe liberación de LDH llegando a obtenerse coeficientes de variación del 6% y límites de detección de 10UI/L, siendo una técnica altamente correlacionable con técnicas de viabilidad celular como el ensayo de Trypan Blue (99).

La evaluación del ensayo de 7-AAD demostró que a la dosis de 100ug/mL existía un incremento en el proceso de apoptosis inducido por el extracto y a esta misma concentración y con el mismo ensayo de 7-AAD la viabilidad celular disminuyó significativamente (Fig. 19); sin embargo, se apreció que a la dosis de 50ug/mL sólo la viabilidad disminuía significativamente pero el valor de  $p=0,0489$  era demasiado cercano a 0,05, lo que no es un dato lo

suficientemente robusto como para considerar que existe un efecto que afecte la viabilidad celular. Cuando se incremento el tiempo de tratamiento con el extracto a 48h se observo que tanto la apoptosis como viabilidad mantuvieron los cambios a la dosis de 100ug/mL, confirmando la inocuidad a dosis inferiores a 100ug/mL incluso con tiempos prolongados de tratamiento (Fig.20). La técnica de 7-AAD esta siendo ampliamente utilizada ya que el colorante 7-AAD puede reemplazar al ioduro de propidio y tiene la ventaja de no necesitar tratamiento con RNAasas pues es selectivo para regiones GC del DNA, siendo una adecuada técnica para evaluar no sólo la apoptosis (comparable al uso de Anexina V) sino también la viabilidad celular (100). Nuestro resultado se asemeja con el estudio de An-Chin Ch et al (122) en relación únicamente a la dosis inductora de apoptosis, ya que An-Chin Ch hizo un estudio más exhaustivo sobre una línea celular cancerígena (HL-60), demostrando que el extracto de *U. tomentosa* obtenido por extracción secuencial con compuestos orgánicos como *n*-hexano y acetato de etilo (CC-EA) era capaz de inducir apoptosis a la dosis de 100ug/mL, dosis a la que se observó una fragmentación del DNA, acompañada de cambios morfológicos y condensación cromosomal pero más aún la vía de apoptosis que era inducida por CC-EA era la vía mitocondrial o intrínseca debido a que había liberación de *citocromo c* hacia el citosol y un incremento en la producción de ROS, lo que a su vez promovió la activación del sistema de caspasas (3 y 9) con la generación final de una DNAasa activada por caspasas (CAD) que es la que genera la fragmentación del DNA evidenciada en este estudio. Gracias a este estudio

previo se deja abierta la posibilidad del estudio de esta vía en los monocitos-macrófagos humanos sanos como los utilizados en nuestro estudio.

Dreifuss AA et al no evaluó la actividad citotóxica del extracto bruto de UT-TOA y reporta actividad anti-oxidante en el rango de 1 – 300ug/mL; sin embargo, nuestros resultados indican que el mismo extracto tendría actividad biológica libre de citotoxicidad por debajo de los 100ug/mL. Según lo anteriormente discutido es probable que del 2012 al 2016 (años en que se usaron estos extractos de UT) haya habido una pérdida de la potencia biológica del extracto por el tiempo de almacenamiento y también es probable que no se haya evidenciado el efecto citotóxico debido a que el ensayo anti-oxidante no utiliza células y se trata de una reacción colorimétrica entre el extracto y el reactivo DPPH.

Por lo tanto, de manera robusta este estudio demuestra que el extracto de UT-TOA es inocuo en el rango de 6,25 – 100ug/mL luego de 24h de tratamiento de los monocitos-macrófagos humanos ensayados.

Uno de los siguientes pasos en la evaluación del extracto de UT-TOA fue determinar su efecto sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), la cual junto con otros compuestos antimicrobianos contenidos en la membrana del fagosoma, es utilizada por el sistema de monocitos-macrófagos como mecanismo de defensa ante los microorganismos que fagocitan y posteriormente eliminan (52,102,123,124). Los resultados obtenidos indican que 25ug/mL de UT-TOA incrementa niveles significativos de ROS y además resulta sorprendente que sólo a esta dosis se haya encontrado esta actividad incrementada a pesar de que se ha evaluado

dosis superiores donde no se ve el mismo efecto. Una razón probable es que dosis superiores a 25ug/mL podrían saturar e inhibir los mecanismos relacionados a la producción de ROS y que esta dosis sería la ideal para el incremento de ROS. Al respecto, este es el primer ensayo que demuestra tal efecto sobre monocitos-macrófagos humanos tratados con UT-TOA, ya que sólo existe un estudio realizado por Menghini L et al (125) quien utilizando macrófagos estimulados con LPS determina que una mezcla de extractos provenientes de *Uncaria tomentosa*, Shiitake (hongo comestible) y Ribes o grosella (arbusto caducifolio), comercialmente conocido como IMOVIRAL™, disminuyen la producción de ROS. En este caso el efecto es contrario al encontrado en nuestro estudio y probablemente se deba al agente estimulante (LPS) que induce un estrés oxidativo antes que actúe el extracto pero además debe estar en contacto con una mayor cantidad de macrófagos ( $0,5 - 1 \times 10^6$ ) y por un tiempo de 24h para lograr inducir la producción de ROS (126); sin embargo, en nuestro caso el estallido respiratorio es inducido y evaluado en corto tiempo (1h30min) por los agentes inductores de ROS (PMA, ZNO y fMLP) y los monocitos-macrófagos son pre-tratados con UT-TOA. Además, es posible que otros metabolitos presentes en el producto IMOVIRAL™ además de los que contiene *Uncaria* contribuyan a tal efecto, es decir, la composición química es totalmente distinta a la de UT-TOA.

En nuestro caso, tanto a las 2h como a las 24h de tratamiento con UT-TOA, los monocitos-macrófagos estuvieron en capacidad de incrementar la producción de ROS incluso por encima de la generada por los inductores

(PMA, ZNO y fMLP). Además, cuando se trataron monocitos-macrófagos con 25ug/mL de UT-TOA por 24h y luego se co-cultivaron con *Candida albicans* estos también mostraron una tendencia a incrementar la producción de ROS, lo que significa que UT-TOA podría activar mecanismos citotóxicos típicos del proceso de fagocitosis contra este hongo. Es posible que este sea el mecanismo que utiliza *Uncaria* para incrementar la fagocitosis como lo demostró Groom SN et al (12) o como también lo hicieron Keplinger K et al (11) y Wagner H (127) con el extracto y con la fracción alcaloide oxindólica (isopteropodina). Este tipo de efectos aparentemente opuestos obtenidos por nuestro estudio y el de Menghini L et al se pueden dar dependiendo del tipo o fracción de extracto utilizado, por ejemplo, Nguyen H-YT et al. encontraron que monocitos humanos tratados con distintas fracciones de *Crinum latifolium* y estimulados con PMA, ZNO o fMLP tenían efectos opuestos sobre la producción de ROS; mientras que con PMA y fMLP, la fracción alcaloide y los extractos flavonoide y acuoso incrementaban la producción ROS, con PMA y ZNO, los extractos acuoso y alcaloide disminuyen la producción de ROS (52). Recientemente, Kosmider A et al. ha demostrado un efecto diferencial sobre la producción ROS en triplicados de tres experimentos independientes usando líneas celulares cancerígenas (HepG2) y fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF), al encontrar que un extracto acuoso rico en alcaloides oxindólicos pentacíclicos (13% de la masa de extracto seco, principalmente mitrafilina, isomitrafilina y pteropodina); compuestos fenólicos ricos en taninos y además libre de alcaloides oxindólicos tetracíclicos, el cual fue obtenido a

partir de la decocción de hojas secas de *Uncaria tomentosa*, incrementó (rango de 72,5 – 145ug/mL) o disminuyó (rango de 30-145ug/mL) la producción de ROS en células HepG2 o NHDF, respectivamente (128). Comparando con nuestros resultados se presentan diferencias a nivel de las células normales y el tipo de extracto, mientras nosotros utilizamos monocitos-macrófagos de sujetos sanos y un extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa*, Kosmider A et al. utiliza una línea celular de fibroblastos y un extracto acuoso. Por tanto, siendo células distintas ya puede existir una respuesta biológica distinta y en el caso de los extractos es sabido que los extractos acuosos contienen mayores compuestos polares que los extractos hidroalcohólicos y por el contrario los extractos hidroalcohólicos retienen otros compuestos que normalmente son solubilizados en los extractos acuosos pudiendo ser esta una característica a tener en cuenta en los distintos efectos encontrados frente a distintas preparaciones (128). Bors M et al. (98) utilizando PBMC pero sin la fracción de monocitos-macrófagos demostraron que los extractos etanólicos (96% de etanol) de la corteza y hojas de *Uncaria tomentosa* incrementaron significativamente la producción de ROS a 50ug/mL y 100ug/mL, respectivamente, resultado que se asemeja al de nuestro estudio pero con la diferencia que usamos sólo monocitos-macrófagos y una dosis de 25ug/mL, nuevamente aunque el efecto es el mismo las diferencias en las concentraciones pueden deberse a la preparación de los extractos, ya que el nuestro contenía un 70% de etanol y el de Bors M tenía una 96% de etanol. Existen evidencias de que el contenido alcaloide es superior en los extractos

etanólicos y probablemente dentro de ellos a mayor porcentaje de etanol mayor concentración de los mismos. En el estudio de Bors M et al. los extractos acuosos tienen menor contenido de alcaloides y no fueron muy eficientes en incrementar la producción de ROS comparado con el extracto etanólico (98).

Otros fitofármacos también han demostrado actividades sobre ROS, por ejemplo, un extracto de la raíz de una planta de la medicina tradicional alpina, *Doronicum austriacum* demostró la inhibición de la producción de ROS en macrófagos J774A.1 en el rango de 5 – 50 ug/mL. En este caso no sólo se demostró la actividad antioxidante sino también se indicó que habría un efecto antiinflamatorio debido a que ROS contribuye al proceso inflamatorio y su disminución se relaciona con tal efecto (124). Esta sería una evidencia más del rol dual de ROS, ya que no sólo su incremento favorece la eliminación de agentes infecciosos o células malignas sino también que su disminución tendría un rol antiinflamatorio.

Antes y después del proceso fagocítico están involucrados no sólo mecanismos de reconocimiento de los microorganismos, que son llevados a cabo por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), sino también la producción de citoquinas y quimioquinas que no solo activan a los monocitos-macrófagos sino también promueven su movilización. Estos mecanismos también se relacionan a la polarización M1/M2, la cual puede desatar mecanismos proinflamatorios (M1), antiinflamatorios (M2) o ambos (mixtura M1/M2) sobre todo en procesos patológicos. En este estudio se ha intentado realizar un seguimiento no sólo a nivel

transcripcional sino también a nivel de la expresión de las proteínas que se derivan de los genes relacionados a la polarización de monocitos-macrófagos.

Los resultados indican que a nivel transcripcional la polarización de monocitos-macrófagos transita entre el fenotipo M2 y el mixto M1/M2 dependiendo del tiempo de tratamiento y a nivel de la expresión de receptores y citoquinas del linaje monocito-macrófago el extracto de UT-TOA (25ug/mL) induce una polarización M1 (por la citoquina IFN- $\gamma$ ) que tiende a ser mixta M1/M2 a partir de las 24h de tratamiento; sin embargo, dado que el proceso aislamiento podría tener como posibles contaminantes a los linfocitos estos podrían contribuir a la producción de IFN- $\gamma$  pero independientemente de la fuente de origen de esta citoquina su inducción por UT-TOA es positiva debido a que IFN- $\gamma$  no sólo colabora en la respuesta M1 sino también a nivel de las respuestas de tipo Th1. Por otro lado, como se puede apreciar en las Fig. 26, 27 y Tabla 07, aunque los patrones de expresión de los genes relacionados a la polarización M1/M2 son diferentes luego del tratamiento con UT-TOA durante 6h y 16h, existe en líneas generales un incremento del 16,6% de los marcadores M2 a las 6h y una disminución de los mismos luego de las 16h además de otros marcadores M1/M2 dejando en evidencia que la capacidad de inducción transcripcional de UT-TOA no es un proceso sostenido sino más bien cortoplacista. Estos resultados pueden ser interesantes cuando se evalúen condiciones patológicas en las que se requiera que la actividad de monocitos-macrófagos migre hacia una polarización M2 o M1/M2. Como

se menciono anteriormente nuestros resultados se asemejan a nivel transcripcional (t=6h) con los encontrados por Monserrat-de la Paz et al (117) quien refiere que el compuesto alcaloide oxindólico pentacíclico, mitrafilina (MTP) aislado del extracto alcohólico de la corteza de *U. tomentosa* induce una polarización M2 (117), lo anterior puede avalar las propiedades anti-inflamatorias de *Uncaria* al menos a nivel transcripcional, ya que a la concentración y tiempos evaluados no se ha podido demostrar este efecto a nivel proteomico. Otra coincidencia encontrada es a nivel de una de las vías regulatorias claves en la migración de los monocitos-macrófagos determinada por el eje CCR2-CCL2, ya que ambos estudios se observo que tanto CCR2 (marcador M2) como CCL2 (marcador M1) se incrementan o tienden a incrementar; sin embargo, cabe destacar que hemos utilizado un extracto crudo, el cual contiene concentrados todos los compuestos de la planta a diferencia de Monserrat-de la Paz que uso MTP, es decir un solo principio activo. Es de notar que en el presente estudio las células han sido evaluadas en su estado natural, es decir, sin recibir ningún estímulo químico que "per se" cambie su perfil celular como es el caso del uso de LPS, IFN- $\gamma$  o IL-4 antes de enfrentarse a *U. tomentosa*, por tanto algunos resultados diferentes podrían explicarse a este nivel. Si nos restringimos a las directrices del consenso logrado en el congreso internacional de inmunología del 2013 en Milán, Italia y teniendo en cuenta el modelo de activación multidimensional (21,29), diríamos que el extracto UT-TOA (25ug/mL) en un escenario de ausencia de estímulos adicionales más que del propio extracto induce una polarización M2 a las

6h y una mixta M1/M2 a las 16h en monocitos-macrófagos humanos a nivel transcripcional, esto último ha sido descrito por Ivashkiv LB et al (51) quien declara que existen patologías como el cáncer donde los múltiples factores liberados por los tumores condicionan la presencia ambos fenotipos M1/M2, es decir existirían factores epigenéticos que aunque no alterarían el código genético controlarían cómo se codifica la información en el DNA.

Cuando evaluamos la polarización M1/M2 a nivel proteico, según el sistema CD68(M1)/CD163(M2) recomendado por Fadini GP et al y Tedesco S et al. (47,129) se observó que los marcadores M1 y M2 estuvieron presentes pero no fueron modificados por UT-TOA es decir se mantendría una polarización mixta. Asimismo, cuando se evaluó la producción de citoquinas relacionadas a la polarización M1/M2 como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (M1) y IL-10, IL-6 (M2) sólo se encontró un incremento de IFN- $\gamma$  una citoquina relacionada a la polarización M1 y Th1 (Fig. 31A); mientras que las demás citoquinas mostraron tendencias a incrementar su concentración luego de 24h de tratamiento con UT-TOA pero que no alcanzaron a ser significativas (Fig. 31B-D). Moserrat-de la Paz (117) también evaluó los niveles de TNF- $\alpha$  y IL-6 en el sobrenadante de cultivo celular y encontró que ambas citoquinas eran inhibidas por MTP, estos resultados son opuestos a los nuestros; por su parte Lemaire I et al. (130) demostró en macrófagos alveolares de ratas el incremento de IL-6 y IL-1, ambos de naturaleza proinflamatoria como el TNF- $\alpha$  y sin bien es cierto muchos estudios como los de Sandoval M et al (17) y Rojas-Duran R et al

(131) atribuyen las propiedades antiinflamatorias de *Uncaria tomentosa* a su capacidad de inhibir la producción de TNF- $\alpha$ ; sin embargo, debemos tener en cuenta que las células que usaron ya sea in vitro o in vivo recibieron estímulos previos principalmente de LPS, un conocido agente inductor de la producción de esta citoquina, por lo que la actividad de *Uncaria* es distinta con y sin el estímulo. Durante el estudio ensayamos la medición de TNF- $\alpha$  en monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA y estimulados con LPS (datos no publicados). Los datos demuestran que UT-TOA inhibe la producción de TNF- $\alpha$  pero a partir de 500ug/mL dosis considerada citotóxica en este estudio. Adicionalmente, la evaluación estadística demostró que el factor tiempo ejerce influencia en la producción de estas citoquinas, es decir a mayor tiempo menor producción de estas citoquinas, lo que demuestra que el tratamiento con UT-TOA promoverá la producción de citoquinas de manera eficiente sobretodo a las 24h o tal vez menos y que esta producción no es sostenida.

El seguimiento a nivel transcripcional y proteico sólo fue posible con algunas moléculas como las anteriormente evaluadas; sin embargo, es importante destacar que en el caso de TNF- $\alpha$  si bien hay una tendencia a incrementar la producción de la proteína luego de 24h de tratamiento con UT-TOA, no se ha podido precisar el tiempo exacto en el cual se produce también el incremento de la expresión de su RNAm, ya que a las 6h la expresión no varia y a las 16h la expresión disminuye significativamente, por tanto es posible que el tiempo requerido para inducir la expresión del gen de esta citoquina se encuentre entre las 6h y 16h, requiriendo una

evaluación adicional. Sin embargo, la disminución en la expresión del RNAm de *tnf- $\alpha$*  a las 16h si se relacionaría con una tendencia a disminuir la producción de esta citoquina a las 72h en nuestro modelo (Fig. 31B).

Adicionalmente, la IL-10 como proteína no mostró diferencias estadísticamente significativas en su producción tras el tratamiento con UT-TOA a los tiempos de 24h, 48h y 72h; sin embargo, esta citoquina mostró una tendencia al incremento en los tiempos evaluados (Fig. 31C), lo que sugeriría un posible efecto promotor de esta citoquina anti-inflamatoria.

Tomados juntos los resultados de las citoquinas se puede concluir que UT-TOA (25ug/mL) induce una polarización M1 sólo debido a IFN- $\gamma$  pero con una tendencia mixta M1/M2.

En el caso de los receptores M1: CD16 y M2: CD163 y CD206 estos no cambiaron su producción como proteínas luego del tratamiento con UT-TOA (25ug/mL) por 24h (Fig. 30), pero presentaron distintos patrones de expresión en su RNAm, siendo este incrementado a las 6h pero disminuido a las 16h principalmente para los marcadores M2 (Fig. 27C,F), según estos resultados se sugiere evaluar la producción de estas proteínas antes o después de las 24h de tratamiento con UT-TOA para encontrar el tiempo que refleje lo encontrado con la expresión de sus RNAm.

La evaluación individual de moléculas como el receptor de manosa (*cd206*), a pesar que solo incrementa su RNAm a las 6h (Fig. 27C) y el incremento en la producción de ROS en presencia o no de agentes infecciosos como *C. albicans* nos hacen hipotetizar que UT-TOA podría

contribuir con un efecto positivo en el eje microbicida CD206-ROS demostrado por Levèvre L et al. (105) en el modelo de respuesta de macrófagos frente a *Leishmania* donde demuestra que los receptores Dec-1 y CD206 activan las vías de señalización Syk-p47phox y ácido araquidónico-NADPH oxidasa necesarias para la producción de ROS.

El grupo de receptores opsonizantes como el receptor del extremo Fc de las IgG (FcγRIII) (CD16b) representan no solo marcadores del fenotipo M1 que muestran una tendencia a incrementarse a nivel transcripcional durante las primeras 6h de tratamiento con UT-TOA (25ug/mL) (Fig. 26G) sino también a PRRs capaces de contribuir al reconocimiento y la eliminación de microorganismos y aunque la producción de la proteína tampoco se ve reflejada en la expresión diferencial en la superficie de monocitos-macrófagos tratados con el extracto es importante tener en cuenta que al igual que otros receptores es posible que el tiempo que requieren para su expresión puede ser el factor que haga la diferencia en cuyo caso recomendamos hacer este seguimiento.

Las quimioquinas también forman parte de los marcadores de polarización M1/M2 además de que su función es importante para la movilización y atracción celular sobretodo en el caso del eje CCL2-CCR2 donde su activación determina el reclutamiento de fagocitos mononucleares a los lugares de infección o inflamación (39,132). Las únicas quimioquinas donde UT-TOA a nivel transcripcional tuvo un efecto positivo con tendencia al incremento es *ccl2* (M1) (Fig. 26E) y con un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) *ccr2* (M2) (Fig. 27E) este es un patrón mixto

M1/M2 en el que ambas quimioquinas promueven la movilización de linfocitos Th2 según lo demostrado por Gu L et al. (132) pero en macrófagos estimulados con IL-4 o IL-13 (39); sin embargo, en nuestro caso los monocitos-macrófagos sólo fueron enfrentados a UT-TOA (25ug/mL) y sería importante determinar el efecto de este resultado sobre la polarización Th2.

El grupo de citoquinas asociadas a polarización M1/M2 evaluadas son *tnf- $\alpha$* , *il-1 $\beta$* , *il-12p40* (M1) y *il-1ra*, *tgf- $\beta$* , *il-10* (M2). Los resultados demuestran también una polarización mixta a las 6h de tratamiento con UT-TOA (25ug/mL) en donde a pesar que no hay cambios significativos en la expresión relativa del RNAm ambos patrones M1/M2 están presentes; mientras que a las 16h el patrón mixto se mantiene pero disminuyendo los M1(*tnf-a* y *il-1b*) y los M2 (*il-ra* y *tgf-b*) (Tabla 07).

Desde el punto de vista técnico existe la posibilidad de que la presencia de IFN- $\gamma$  se deba a la presencia de linfocitos no eliminados durante el proceso de adherencia de los monocitos-macrófagos; sin embargo, es importante mencionar que Darwich L et al. (35) demostraron que tras el estímulo con IL-12 y IL-18 los monocitos y macrófagos humanos son capaces de producir IFN- $\gamma$  por lo tanto quedará abierta la posibilidad de que en el presente estudio el tratamiento con UT-TOA haya inducido la producción de IFN- $\gamma$  en monocitos-macrófagos o en linfocitos no adherentes y no eliminados.

Luego de la evaluación de UT-TOA sobre células como los monocitos-macrófagos de sujetos sanos se quizá evaluar la actividad de este mismo

extracto pero en un contexto patológico como el cáncer donde es sabido que los factores liberados por el tumor modulan gran parte de la respuesta inmune a su favor con lo que el sistema inmune no puede contrarrestar el avance de una enfermedad maligna como esta. En ese contexto se escogió la evaluación a nivel sistémico y en el microambiente tumoral de parámetros inmunológicos en un modelo murino de melanoma B16/BL6 el cual es un tumor sólido que involucra la participación de células inmunocompetentes y sus moléculas mensajeras como las citoquinas.

Uno de los parámetros para evaluar la progresión de una patología es la relación de linfocitos CD4/CD8, la que en sujetos sanos es aproximadamente de 2 a 1 y cambios o reversiones en la misma suelen relacionarse a progresiones de infecciones virales, casos de neumonía e infarto al miocardio (133). Asimismo, bajas relaciones CD4/CD8 se correlacionan con progresión tumoral y metástasis (134); mientras que relaciones incrementadas, donde hay mayor proporción de LT CD4 que colaboran con los LT CD8 en la respuesta antitumoral, es lo que se espera a pesar que estas relaciones suelen ser distintas dependiendo de los tumores (135); sin embargo, no se debe dejar de lado el estado funcional de las células pues es el que determinará una correcta respuesta.

El estudio realizado con el extracto de UT-TOA demostró que este extracto ejercía mejores efectos inmunomoduladores a nivel sistémico que en el microambiente tumoral. Precisamente el primer hallazgo a nivel sistémico consistió en comprobar que a pesar que el control negativo (sin melanoma) y el control positivo (con melanoma) presentaban la misma

relación de linfocitos CD4/CD8a (Fig. 35A); el nivel de activación de estas células expresado por el marcador CD44 era significativamente más bajo en el control positivo (Fig. 35B), es decir que manteniendo la misma frecuencia porcentual de células; sin embargo, las células del control positivo tenían una baja capacidad funcional, probablemente por la actividad inmunosupresora del tumor. En lo que respecta al tratamiento con UT-TOA se evidenció que a la dosis de 1000mg/kg se producía un incremento significativo de la relación CD4/CD8a , es decir se promovía el incremento porcentual de LT CD4+ (Fig. 35A). De manera interesante a esta misma dosis existió una tendencia a incrementar el marcador de activación CD44 pero donde si se logro recuperar la capacidad de activación (CD44) comparable incluso a la del control negativo fue a las dosis de 50 y 500mg/kg. (Fig. 35B), mientras que a 1000mg/kg existió una tendencia que se mantuvo por encima del control positivo. Lamentablemente en el microambiente tumoral no se obtuvieron cambios significativos en los parámetros anteriormente evaluados excepto una tendencia a incremento de la relación CD4/CD8a a la misma dosis sistémica (Fig. 35C y D). En un estudio con ratones Balb/c sanos Domingues A et al (96) demostró que los linfocitos esplénicos tratados con 125mg/kg y 500mg/kg de un extracto hidroalcohólico de *U. tomentosa* también incrementaron significativamente la relación de linfocitos CD4/CD8a, es decir existió un importante incremento de los LT CD4+, estos resultados aunque en distintos modelos y concentraciones de los extractos se asemejan a los hallazgos en el modelo de melanoma.

A nivel del microambiente tumoral no hubo variación en los porcentajes de poblaciones de linfocitos T totales ( $CD3^+$ ), linfocitos NK ( $NK1.1^+CD3^-$ ), linfocitos NKT ( $NK1.1^+CD3^+$ ) y células dendríticas plasmacitoides ( $CD11c+CD11b^{low/-}$ ) (Fig. 37), mientras que si se observó un incremento significativo de la población de células dendríticas mieloides ( $CD11c^+CD11b^{brigh}$ ) a la dosis de 100mg/kg (Fig.37E), lo que daría indicios de algún grado de inmunomodulación en el microambiente tumoral. No existen muchos estudios sobre los efectos de UT sobre células dendríticas murinas y los que hay han sido desarrollados frente a células dendríticas humanas y mayormente con una especie distinta a UT como es la *Uncaria rhynchophylla*, con la que Bae WK et al (87) ha demostrado que el ácido uncarínico C (URC) junto con  $IFN-\gamma$  es capaz de incrementar la maduración y activación de las DC y además inducir la producción de IL-12 con la que además puede redireccionar una respuesta Th1 que puede ser antitumoral. Cabe mencionar que en uno de nuestros estudios sobre UT y células dendríticas mieloides humanas no encontramos diferencias en los porcentajes poblacionales luego del tratamiento con 50 y 100ug/mL y sólo se evidenció una disminución a concentraciones superiores a 500ug/mL las que según nuestra evaluación sería producto más bien de un efecto citotóxico (78). Por tanto, dado que el porcentaje poblacional de DCm resultó incrementado luego del tratamiento con UT-TOA, resultaría interesante demostrar si además existen cambios en los niveles maduración y activación que permitan mejorar la presentación de antígenos tumorales en el microambiente tumoral, en vista que las células

dendríticas son un componente celular útil en las vacunas celulares contra los tumores y que se requiere de mejores estrategias para mejorar su funcionalidad en este esquema de inmunoterapia como lo indicamos en nuestro artículo de revisión (77).

Casi de la mano con la actividad de células dendríticas y de los macrófagos M1/M2 esta la polarización Th1/Th2, la que hoy en día además es complementada por la Th17 y las demás subpoblaciones de LTh que se encuentran en muchos casos en etapa de estudios que dilucidarán su función no sólo en modelos animales sino también en humanos como en el caso de las mencionadas anteriormente.

En cuanto al perfil de citoquinas, se evaluaron las citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2); Th2 (IL-4, IL-6 y IL-10) y Th17 (IL-17A) en PBMC y las citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ); Th2 (IL-6 y IL-10); IL-12p70 y MCP-1 en MTMC siendo el principal hallazgo que a nivel del tratamiento de PBMC con 1000mg/kg de UT-TOA se mostró un incremento significativo de TNF- $\alpha$  (Th1) y una disminución significativa de IL-17A (Th17), mientras que no hubo variación en las citoquinas IL-6, IL-10 (Th2) (Fig.38), tampoco hubo variación en otras citoquinas como IL-2, IL-4 sistémicas y IL-12p70 y MCP-1 del MTMC (Fig.39). Al respecto, el único trabajo que evalúa las citoquinas Th1/Th2 en células de ratones sanos tratados con un extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* es el de Domingues A et al (96), quien demostró una polarización Th2 caracterizada por el incremento de las citoquinas IL-4 y IL-5 a una dosis de 500ug/mL mientras que a la misma concentración las citoquinas Th1

(IL-2, TNF- $\alpha$  y INF- $\gamma$ ) disminuían. Además Bae WK et al (87) demostró que las DC tratadas con URC promovían la polarización de linfocitos Th1 productores de IFN- $\gamma$ . En este caso nuestros resultados son opuestos a los de Domingues A y coinciden con los de Bae WK, en el primer caso se tendría que tener en cuenta que existen condiciones distintas a las nuestras como que las células provienen del bazo de ratones sanos, que fueron estimuladas previamente con el mitógeno ConA (concanavalina, que promueve la proliferación linfocitaria) y que el tratamiento con los extractos fue por 48h; mientras que en el caso de Bae WK a pesar que se trata de otra especie de *Uncaria* ambos casos promueven una respuesta Th1 y utilizan células obtenidas a partir de sangre periférica.

En relación a la citoquina Th17, IL17A la búsqueda bibliográfica nos indica que este es el primer estudio donde se evalúa esta citoquina junto con UT y en nuestro caso a nivel sistémico UT-TOA produce una disminución significativa de IL-17A (Fig. 39E). Al respecto, los estudios sobre la población de linfocitos Th17 y la IL-17A en cáncer son bastante controversiales debido a que ambas propiedades pro y anti tumorales han sido propuestas para esta citoquina pero definitivamente la infiltración tumoral de células Th17 sugiere un rol importante en la respuesta contra tumores. Precisamente en un modelo de melanoma murino como el utilizado en este estudio Kulig P et al (136) evaluó la capacidad de metástasis pulmonar de las células B16 y encontró que IL-17A que cuenta con receptores IL-17AR y IL-17RC en células epiteliales y endoteliales promovió la metástasis pulmonar al regular la función de la barrera

endotelial y la extravasación de células tumorales desde la circulación hacia el parénquima pulmonar. Por lo tanto, el resultado encontrado con IL-17A concuerda mejor con una respuesta antitumoral a nivel sistémico. Con la información obtenida con todos los parámetros inmunológicos medidos se procedió a realizar evaluaciones de correlación entre ellos y se encontró que existían tendencias de correlación positiva entre CD4<sup>+</sup>/CD8a<sup>+</sup> y TNF- $\alpha$  y de correlación negativa entre CD4<sup>+</sup>/CD8a<sup>+</sup> y IL-17A pero que no fueron significativas, es decir posiblemente el incremento de la población de linfocitos T CD4 justificaría el incremento de TNF- $\alpha$  y la disminución de IL-17A. Es decir a nivel sistémico el tratamiento con UT-TOA posiblemente permitiría una polarización de la respuesta Th1 antitumoral y una disminución de la respuesta Th17 protumoral.

Finalmente, si bien los modelos mixtos M1/M2 son encontrados especialmente en condiciones patológicas como lo refiere Italiani P et al. (48) y el análisis del transcriptoma muestra diferencias como las que se han encontrado en este estudio, pero además el estudio en una patología como el cáncer sugiere una mejora de la respuesta inmune aunque esta sea sistémica y no en el microambiente tumoral es importante resaltar que productos naturales como *Uncaria tomentosa* son consumidos de manera preventiva como inmunoestimulantes y no como una solución paliativa por lo que saber que es lo que sucede con células inmunocompetentes tras el tratamiento con extractos como el utilizado en este estudio nos dará mayor evidencia para recomendar la realización de estudios de fase clínica ya sea con extractos o con alguno de los compuestos químicos que han

sido aislados de la planta y además recomendar su uso como parte de la medicina alternativa.

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Tomados juntos los resultados de la evaluación de la actividad biológica del extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con un contenido de alcaloides oxindólicos totales de 5,03% (UT-TOA) se concluye que en:

- **Monocitos-macrófagos de humanos sanos**
  - El extracto es inocuo en el rango de 6,25 – 100ug/mL para células provenientes de sujetos aparentemente sanos.
  - Incrementa la producción de ROS pudiendo tener actividad microbicida frente a patógenos como *Candida albicans*; sin embargo, se recomienda la evaluación funcional de esta actividad (Por ej. evaluación de la unión a receptores de reconocimiento y del proceso de fagocitosis).
  - A nivel transcripcional y de expresión de receptores y citoquinas existen más evidencias de una polarización mixta M1/M2 y se recomienda que a nivel transcripcional se incremente el número de muestras para confirmar este resultado.
  - Se incrementa la producción de IFN- $\gamma$ , una citoquina importante para la respuesta contra patógenos intracelulares; sin embargo, se debe descartar que también

haya sido producida por linfocitos contaminantes durante el aislamiento de los monocitos-macrófagos.

- Es importante resaltar que para el modelo con monocitos-macrófagos humanos aparentemente sanos, el tratamiento con UT-TOA no estuvo acompañado de estímulos adicionales, lo que permitió reflejar las condiciones fisiológicas típicas en que se mantienen estas células.

- **Modelo de melanoma inducido en ratones**

- Los mejores efectos encontrados se dan más a nivel sistémico (sangre periférica) que en el microambiente tumoral. Por tanto, es importante evaluar la biodisponibilidad del extracto para determinar en qué grado sus metabolitos podrían alcanzar el microambiente del tumor.
- A una dosis de 1000mg/kg incrementa la relación CD4/CD8a y de la citoquina Th1 TNF- $\alpha$  y la disminución de la citoquina Th17 IL-17A, incluyendo una tendencia a mejorar la activación linfocitaria
- La única población inmunocompetente que mostró un cambio significativo en el microambiente tumoral fueron las células dendríticas mieloides; sin embargo, debería determinarse si fueron estimuladas sistémicamente o en el microambiente tumoral.

- De los resultados anteriores se concluye que debe hacerse una valoración costo-beneficio, es decir es mejor contar no tanto con mayores frecuencias de linfocitos T sino promover la capacidad de activación de estas células, la cual mejoraría la respuesta de las células inmunocompetentes en el modelo de melanoma utilizado.
- Aunque se conoce el contenido de alcaloides oxindólicos totales, no se descarta que los efectos biológicos encontrados se deban también a una sinergia con los otros metabolitos componentes del extracto y que no han sido identificados y cuantificados en este estudio.
- Se recomienda estandarizar la preparación de los extractos de UT e identificar los principales grupos químicos que han demostrado efectos biológicos significativos. Además para su uso en estudios experimentales se recomienda la evaluación previa de la inocuidad de la preparación y en el caso de almacenamientos prolongados repetir las cuantificaciones químicas así como también una evaluación de la potencia biológica del extracto a fin de garantizar su calidad.
- Los datos obtenidos de este estudio deben considerarse como un aporte al conocimiento básico de los efectos biológicos de *U. tomentosa* y no como una evidencia definitiva para lo que se recomienda mayores estudios pre-clínicos.

## 8. ANEXOS

### *Anexo 01 - SECUENCIAS DE PRIMERS PARA PCR DE GENES HUMANOS*

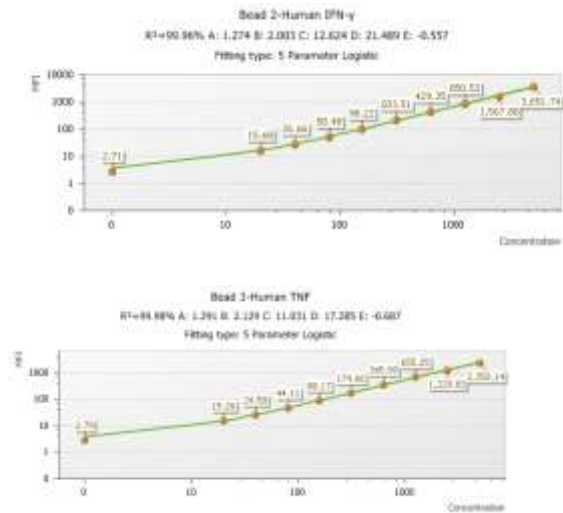
	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
1	IL-1b (s)	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
2	IL-1b (as)	GATCCA CACTCTCCAGCTGCA
3	TNF (s)	AGGCTGTGCATTGCACCTCA
4	TNF (as)	GGGACAGTGACCTGCACTGT
5	IL-6 (s)	GAGGATAACCACTCCCAACAGACC
6	IL-6 (as)	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
7	MR (s)	ATGCCAAGTGGGAAAATCTG
8	MR (as)	TGTAGCAGTGGCCTGCATAG
9	Dec-1 (s)	CATCGTCTCACCGTATTAATGCAT
10	Dec-1 (as)	CCCAGAACCATGGCCCTT
11	IL-1ra-H-L	TGGGAATCTCAGATGGGAAG
12	IL-1ra-H-R	CTGTGTCCCCCAGAACTTGT
13	IL-12p40 (s)	GCCCAGCTGCTGAGGAGAGT
14	IL-12p40 (as)	TGGGTGGGTGAGGTTTGATG
15	IL-10-H-L	TGCAAAACCAAACCACAAGA
16	IL-10-H-R	TCTCGGAGATCTCGAAGCAT
17	TLR-2-H-L	TCCTGTTGTTGGACAGGTCA
18	TLR-4-H-R	CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC
19	CCL17-H-L	AGGTCTTGAAGCCTCCTCAC
20	CCL17-H-R	AGTTCAGACAAGGGGATGGG

21	CCR2-H-L	TGGCTGTGTTTGCTTCTGTC
22	CCR2-H-R	CCCGAGTAGCAGATGACCAT
23	CD163-H-L	AAGCTGATGTGGTTTGCAGG
24	CD163-H-R	CCATTGCCAGTTCTTGCAGT
25	CD16b-H-L	TACAGCGTGGAGAAGGA
26	CD16b-H-R	GCACCTGTACTCTCCACTGT
27	CD32AB-H-L	CCAAAGGCTGTGCTGAAACT
28	CD32AB-H-R	TACTCCCCGCTGTCATTGTT
29	DC-SIGN (As)	CAACTTAGAAACAGCCAAATGGAA
30	DC-SIGN (s)	GGGCATGGAGGCTCCAC
31	B-Actine-H-L	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
32	B-Actine-H-R	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

*Anexo 03 – Curvas estándar para citoquinas por CBA*

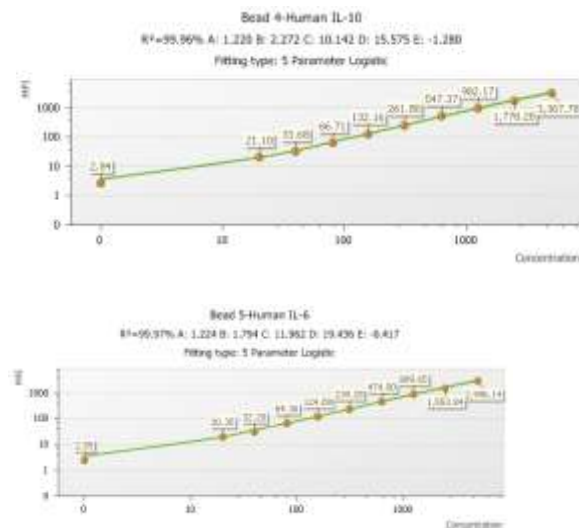
A

B



C

D



**Curvas estándar del ensayo de CBA para la medición citoquinas producidas por monocitos-macrófagos tratados con UT-TOA.** Las curvas representan la concentración de estándares de citoquinas vs la intensidad de fluorescencia media (MFI) generada por cada concentración del estándar de concentración conocida. A partir de estas curvas y por extrapolación se obtuvieron las concentraciones de las citoquinas (pg/mL) evaluadas en el estudio.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ganzera M, Muhammad I, Khan RA, Khan IA. *Uncaria tomentosa*. *Planta Med.* 2001;67:447–50.
2. 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. *Molecules.* 2015;20:22703–17.
3. Pilarski R, Zieliński H, Ciesiołka D, Gulewicz K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2006 Mar 8 [cited 2014 Aug 30];104(1–2):18–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16202551>
4. Gonçalves C, Dinis T, Batista MT. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* [Internet]. 2005 Jan [cited 2014 Aug 29];66(1):89–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649515>
5. Kitajima M, Hashimoto K, Yokoya M, Takayama H, Aimi N. Two New 19-Hydroxyursolic Acid-type Triterpenes from *Uncaria tomentosa* ( Peruvian ' Un. 2000;56:547–52.
6. Aquino R, Tommasi NDE, Simone FDE, Pizza C, Word K. TRITERPENES AND QUINOVIC ACID GLYCOSIDES FROM. *Phytochemistry.* 1997;45(5).
7. Flores-sánchez IJ, Ortega-lópez J, Montes-horcasitas MC, Ramos- AC.

- Biosynthesis of Sterols and Triterpenes in Cell Suspension Cultures of *Uncaria tomentosa*. *Plant Cell Physiol.* 2002;43(12):1502–9.
8. Kang T, Matsumoto K, Tohda M, Murakami Y. Pteropodine and isopteropodine positively modulate the function of rat muscarinic M<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocyte. 2002;444:39–45.
  9. Sheng Y, Akesson C, Holmgren K, Bryngelsson C, Giamapa V, Pero RW. An active ingredient of Cat's Claw water extracts identification and efficacy of quinic acid. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2005 Jan 15 [cited 2014 Sep 9];96(3):577–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15619581>
  10. Falkiewicz B. Vilcacora [ *Uncaria tomentosa* ( Willd .) DC . and *Uncaria guianensis* ( Aublet ) Gmel . ] – a review of published scientific literature. *Case Rep Clin Pr Rev.* 2001;2(4):305–16.
  11. Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP. *Uncaria tomentosa* ( Willd .) DC .— Ethnomedicinal use and new pharmacological , toxicological and botanical results. 1999;64:23–34.
  12. Groom SN, Johns T, Oldfield PR. The potency of immunomodulatory herbs may be primarily dependent upon macrophage activation. *J Med Food.* 2007;10(April 2006):73–9.
  13. Aguilar L, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Klaas CA, et al. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* ( Rubiaceae ). *J Ethnopharmacol.* 2002;81:271–6.
  14. Surh Y-J. NF-kappa B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of

some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17(December 2007):269–72.

15. Sandoval M, Charbonnet RM, Okuhama NN, Roberts J, Krenova Z, Trentacosti AM, et al. Cat's claw inhibits TNF-alpha production and scavenger free radicals: Role in cytoprotection. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(1):71–8.
16. Sandoval-Chacón 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.
17. Sandoval M, Okuhama NN, Zhang X, Condezo LA, Lao J, Angeles FM. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat ' s claw ( *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* ). *Phytomedicine.* 2002;9:325–37.
18. LAUS G, KEPLINGER D. Separation of Stereoisomeric Oxindole Alkaloids from *Uncaria-Tomentosa* by High-Performance Liquid-Chromatography. *J Chromatogr a.* 1994;662(2):243–9.
19. Dreifuss AA, Bastos-pereira AL, Vinicius T, Da Silva B, 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.
20. Dreifuss AA, Bastos-pereira AL, Fabossi IA, Stolf AM, Eduardo C, Souza A De, 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*. 2013;8(2):1–14.
21. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol* [Internet]. 2015;17(1):34–40. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3324>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681460>
  22. Chang HY, Lee H-N, Kim W, Surh Y-J. Docosahexaenoic acid induces M2 macrophage polarization through peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation. *Life Sci* [Internet]. 2015;120:39–47. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320514008662>
  23. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787–95.
  24. Korn D, Frasn SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol*. 2011;2(November):1–10.
  25. Rey-Giraud F, Hafner M, Ries CH. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One*. 2012;7(8).
  26. Dey A, Allen J, Hankey-Giblin P a. Ontogeny and Polarization of Macrophages in Inflammation: Blood Monocytes Versus Tissue Macrophages. *Front Immunol* [Internet]. 2015;5(January):1–15. Available from:

<http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fimmu.2014.00683/abstract>

27. Amit I, Winter DR, Jung S. The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. *Nat Immunol* [Internet]. 2015;17(1):18–25. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3325>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681458>
28. Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*. 2008;181(6):3733–9.
29. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher E a., Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* [Internet]. 2014;41(1):14–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
30. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2012;32(6):463–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428224>
31. Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv wound care* [Internet]. 2012;1(1):10–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3623587&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Fairweather D, Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun* [Internet]. 2009;33(3–4):222–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2009.09.012>

33. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(10):889–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1937>
34. Hamilton T a., Zhao C, Pavicic PG, Datta S. Myeloid Colony-Stimulating Factors as Regulators of Macrophage Polarization. *Front Immunol* [Internet]. 2014;5(November):1–6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fimmu.2014.00554/abstract>
35. Darwich L, Coma G, Peña R, Bellido R, Blanco EJJ, Este JA, et al. Secretion of interferon- $\gamma$  by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology*. 2009;126(3):386–93.
36. Erbel C, Akhavanpoor M, Okuyucu D, Wangler S, Dietz A, Zhao L, et al. IL-17A influences essential functions of the monocyte/macrophage lineage and is involved in advanced murine and human atherosclerosis. *J Immunol* [Internet]. 2014;193(9):4344–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261478>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4201987>
37. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets : cancer as a paradigm. *Nat Immunol* [Internet]. 2010;11(10):889–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1937>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856220>
38. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G.

- Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One*. 2013;8(11):1–11.
39. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677–86.
40. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* [Internet]. 2010;464(7293):1357–61. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08938>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574004>
41. Furlan R, Martino G, Galbiati F, Poliani PL, Smiroldo S, Bergami a, et al. Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination. *J Immunol*. 1999;163(5):2403–9.
42. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* [Internet]. 2015;21(7):677–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26121197>
43. Gris D, Ye Z, Iocca H a, Wen H, Craven RR, Gris P, et al. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol* [Internet]. 2010;185(2):974–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574004>

44. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* [Internet]. 2013;493(7434):674–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254930> <http://www.nature.com/nature/journal/v493/n7434/pdf/nature11729.pdf>
45. Yan Y, Jiang W, Spinetti T, Tardivel A, Castillo R, Bourquin C, et al. Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* [Internet]. 2013;38(6):1154–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.015>
46. Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* [Internet]. 2014;5(October):1–10. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00532/abstract>
47. Fadini GP, Kreutzenberg SV De, Boscaro E, Albiero M. An unbalanced monocyte polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy. *Diabetologia*. 2013;56:1856–66.
48. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol*. 2014;5(514):1–22.

49. Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, et al. Folate receptor  $\beta$  is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory Macrophages. *Cancer Res.* 2009;69(24):9395–403.
50. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008 Mar [cited 2014 Jul 12];8(3):183–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18274560>
51. Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol* [Internet]. 2013;34(5):216–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.11.001>
52. Nguyen HYT, Vo BHT, Nguyen LTH, Bernad J, Alaeddine M, Coste A, et al. Extracts of *Crinum latifolium* inhibit the cell viability of mouse lymphoma cell line EL4 and induce activation of anti-tumour activity of macrophages in vitro. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2013;149(1):75–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.002>
53. Ren K, Jin C, Ma P, Ren Q, Jia Z, Zhu D. Ginsenoside Rd alleviates mouse acute renal ischemia/reperfusion injury by modulating macrophage phenotype. *J Ginseng Res* [Internet]. 2015;40(2):196–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgr.2015.12.003>
54. Gao S, Zhou J, Liu N, Wang L, Gao Q, Wu Y, et al. Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. *J Mol Cell Cardiol*

[Internet]. 2015;85:131–9. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.025>

55. López-García S, Castañeda-Sanchez JI, Jiménez-Arellanes A, Domínguez-López L, Castro-Mussot ME, Hernández-Sánchez J, et al. Macrophage activation by ursolic and oleanolic acids during mycobacterial infection. *Molecules*. 2015;20(8):14348–64.
56. Allen-Hall L, Cano P, Arnason JT, Rojas R, Lock O, Lafrenie RM. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *J Ethnopharmacol*. 2007;109(2):312–7.
57. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice *Immunology* : 1978;75(10):5132–6.
58. Steinman RM, Cohn Z. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *J Exp Med*. 1973;137:1142–62.
59. Celia M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells Marina Celia, Federica Sallusto and Antonio Lanzavecchia\*. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:10–6.
60. Martín-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Aug 18 [cited 2014 Jul 11];198(4):615–21. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2194169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

61. Steinman RM. THE DENDRITIC CELL SYSTEM. 1991;
62. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, et al. Immunobiology of. *Annu Rev Immunol*. 2000;(Figure 1):767–811.
63. Asada H, Kishida T, Hirai H, Shin-Ya M, Imanishi J, Takeuchi M, et al. Combination vaccine of dendritic cells (DCs) and T cells effectively suppressed preestablished malignant melanoma in mice. *Cancer Lett* [Internet]. 2006 Aug 18 [cited 2014 Aug 24];240(1):83–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246489>
64. Guindi C, Ménard M, Cloutier A, Gaudreau S, Besin G, Larivée P, et al. Differential role of NF- $\kappa$ B, ERK1/2 and AP-1 in modulating the immunoregulatory functions of bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice. *Cell Immunol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Aug 24];272(2):259–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22070873>
65. Neves BM, Lopes MC, Cruz MT. Pathogen Strategies to Evade Innate Immune Response: A Signaling Point of View, Protein Kinases [Internet]. Dr. Gabrie. 2012. Available from: <http://scihub.cc/https://www.intechopen.com/books/protein-kinases/pathogen-strategies-to-evade-innate-immune-response-a-signaling-point-of-view>
66. Pulendran B. Division of labor and cooperation between dendritic cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2006 Jul;7(7):699–700. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785884>

67. Zuniga EI, McGavern DB, Pruneda-Paz JL, Teng C, Oldstone MB a. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol* [Internet]. 2004 Dec [cited 2014 Aug 24];5(12):1227–34. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531885>
68. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2000 May;6(5):1755–66. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815894>
69. Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. Mechanism of Immune Dysfunction in Cancer Mediated by Immature Gr-1+ Myeloid Cells. *J Immunol* [Internet]. 2001 May 1 [cited 2014 Aug 24];166(9):5398–406. Available from:  
<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.166.9.5398>
70. Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva a, et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2003 Oct 20 [cited 2014 Aug 5];89(8):1463–72. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2394334&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
71. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J*

- Immunol [Internet]. 2000 Feb 1;164(3):1269–76. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640740>
72. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD, Louis S, Burnet FM, Thomas L. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. 2004;21:137–48.
73. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting : from immuno- surveillance to tumor escape. 2002;3(11):991–8.
74. Kyte J a, Mu L, Aamdal S, Kvalheim G, Dueland S, Hauser M, et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. Cancer Gene Ther [Internet]. 2006 Oct [cited 2014 Aug 24];13(10):905–18. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710345>
75. Smith, Cerundolo V. Immunotherapy of melanoma. Immunology [Internet]. 2001 [cited 2014 Aug 24];104(1):1–7. Available from:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2567.2001.01297.x/abstract>
76. Sims RB. Development of sipuleucel-T: autologous cellular immunotherapy for the treatment of metastatic castrate resistant prostate cancer. Vaccine [Internet]. 2012 Jun 19 [cited 2014 Aug 24];30(29):4394–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22122856>
77. Lozada-Requena I, Núñez C, Aguilar JL. INMUNOTERAPIA EN MELANOMA : VACUNAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS. Rev Peru

- Med Exp Salud Publica. 2015;32(3):555–64.
78. Lozada-Requena I, Núñez C, Álvarez Y, Aguilar JL. Effect of an hydro-alcoholic extract of *Uncaria tomentosa* ( Cat´s Claw ) over dendritic cell subsets and HLA-DR/CD86 molecules by lipopolysaccharides stimulus. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2009;26(2):168–74.
  79. Nuñez C, Lozada-Requena I, Akamine I, Carbajal L, Aguilar JL. Effect of *Uncaria tomentosa* (Cat´s claw) over dendritic cells population and activation in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. Acta Médica Peru. 2008;25(3):135–9.
  80. Park WB, Lyu SY, Kim JH, Choi SH, Chung HK, Ahn SH, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. Cancer Biother Radiopharm. 2001;16(5):439–47.
  81. Liu JD, Chen SH, Lin CL, Tsai SH, Liang YC. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. J Cell Biochem. 2001;83:631–42.
  82. García Giménez D, García Prado E, Sáenz Rodríguez T, Fernández Arche A, De La Puerta R. Cytotoxic effect of the pentacyclic oxindole alkaloid mitraphylline isolated from *uncaria tomentosa* bark on human ewing's sarcoma and breast cancer cell lines. Planta Med. 2010;76:133–6.
  83. Bacher N, Tiefenthaler M, Sturm S, Stuppner H, Ausserlechner MJ, Kofler R, et al. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic

- leukaemia cells. *Br J Haematol* [Internet]. 2006 Mar [cited 2014 Sep 9];132(5):615–22. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16445836>
84. Akesson 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* [Internet]. 2003 Dec [cited 2014 Sep 9];3(13–14):1889–900. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636838>
85. Lopes de Paula LC, Fonseca F, Perazzo F, Cruz FM, Cubero D, Trufelli DC, et al. *Uncaria tomentosa* (Cat’s Claw) Improves Quality of Life in Patients with Advanced Solid Tumors. *J Altern Complement Med* [Internet]. 2014;0(0):1–9. Available from:  
<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/acm.2014.0127>
86. Santos Araújo MDC, Farias IL, Gutierrez J, Dalmora SL, Flores N, Farias J, et al. *Uncaria tomentosa*—Adjuvant Treatment for Breast Cancer: Clinical Trial. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2012;2012:1–8.
87. Bae WK, Umeyama A, Chung I-J, Lee J-J, Takei M. Uncarinic acid C plus IFN- $\gamma$  generates monocyte-derived dendritic cells and induces a potent Th1 polarization with capacity to migrate. *Cell Immunol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Aug 24];266(1):104–10. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933226>
88. Umeyama A, Yahisa Y, Okada M, Okayama E, Uda A, Shoji N, et al. Triterpene esters from *Uncaria rhynchophylla* drive potent IL-12-dependent

- Th1 polarization. *J Nat Med*. 2010;64(4):506–9.
89. Miller AK, Benson JM, Muanza DN, Smith JR, Shepherd DM. Anti-inflammatory effects of natural product formulations on murine dendritic cells. *J Diet Suppl* [Internet]. 2011;8(1):19–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3052397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  90. Ivanova EA, Orekhov AN. T Helper lymphocyte subsets and plasticity in autoimmunity and cancer: An overview. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
  91. Coffman RL. Origins of the T<sub>H</sub> 1-T<sub>H</sub> 2 model : a personal perspective. *Nat Immunol*. 2006;7(6):539–41.
  92. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Apr [cited 2014 Sep 23];10(4):248–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3242804&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  93. Hirahara K, Nakayama T. CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol*. 2016;28(4):163–71.
  94. Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Oct 15];20(1):4–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3494736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  95. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2004 Jan [cited 2014 Jul 9];4(1):11–22. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708024>

96. Domingues A, Sartori A, Maria L, Valente M, Golim MA, Siani AC, et al. *Uncaria tomentosa* Aqueous - ethanol Extract Triggers an Immunomodulation toward a Th2 Cytokine Profile. *Phyther Res.* 2011;25:1229–35.
97. Domingues A, Sartori A, Golim MA, Valente LMM, Da Rosa LC, Ishikawa LLW, et al. Prevention of experimental diabetes by *Uncaria tomentosa* extract: Th2 polarization, regulatory T cell preservation or both? *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011;137(1):635–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.021>
98. Bors M, Michałowicz J, Pilarski R, Sicińska P, Gulewicz K, Bukowska B. Studies of biological properties of *Uncaria tomentosa* extracts on human blood mononuclear cells. *J Ethnopharmacol.* 2012;142(3):669–78.
99. Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiaumont J, Martial A, Marc A, et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *J Biotechnol.* 1992;25(3):231–43.
100. Zembruski NCL, Stache V, Haefeli WE, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem* [Internet]. 2012;429(1):79–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>
101. Morón ÚM, Castilla-Cortázar I. Protection Against Oxidative Stress and “IGF-I Deficiency Conditions” [Internet]. *Antioxidant Enzyme.* 2012. 89-

116 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/51047>

102. Zhang Y, Choksi S, Chen K, Pobezinskaya Y, Linnoila I, Liu Z-G. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Res* [Internet]. 2013;23(7):898–914. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3698641&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
103. Cosentino-Gomes D, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. *Int J Mol Sci*. 2012;13(9):10697–721.
104. Aubouy A, Olganier D, Bertin G, Ezinmegnon S, Majorel C, Mimar S, et al. Nrf2-driven CD36 and HO-1 gene expression in circulating monocytes correlates with favourable clinical outcome in pregnancy-associated malaria. *Malar J* [Internet]. 2015;14(1):358. Available from: <http://www.malariajournal.com/content/14/1/358>
105. Lefèvre L, Lugo-Villarino G, Meunier E, Valentin A, Olganier D, Authier H, et al. The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. *Immunity*. 2013;38(3):1038–49.
106. Olganier D, Lavergne RA, Meunier E, Lefèvre L, Dardenne C, Aubouy A, et al. Nrf2, a ppar $\gamma$  alternative pathway to promote cd36 expression on inflammatory macrophages: Implication for malaria. *PLoS Pathog*. 2011;7(9).

107. Wong M, Medrano J. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39:75–85.
108. Roche. LightCycler® 480 SYBR Green I Master. Manual. 2011;12(4):1–20.
109. Inc. TFS. Thermo Scientific Verso cDNA Synthesis Kit [Internet]. California: Thermo Fischer Scientific, Inc.; 2015. p. 1–4. Available from: [www.thermoscientific.com/onebio](http://www.thermoscientific.com/onebio)
110. Roche Diagnostics. The LightCycler 480 System. Unleash the Potential of Real-Time PCR [Internet]. Roche Diagnostics GmbH. Mannheim: Roche Diagnostics; 2012. p. 1–20. Available from: [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)
111. Tedesco S, Bolego C, Toniolo A, Nassi A, Fadini GP, Locati M, et al. Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* [Internet]. 2014; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298514002770>
112. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. [Internet]. Vol. Chapter 20, *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan ... [et al.]. 2001. Unit 20.1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999004>
113. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012.

114. Lozada-Requena I, Núñez C, Álvarez Y, Kahn L, Aguilar J. Poblaciones linfocitarias, células dendríticas y perfil de citoquinas en ratones con melanoma tratados con *Uncaria tomentosa*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015;32(4):633–42.
115. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* [Internet]. 2000 Dec 18;192(12):1685–96. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
116. Setty AR, Sigal LH. Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology : Mechanisms of Action , Efficacy , and Side Effects. 2005;
117. Montserrat-de la Paz S, de la Puerta R, Fernandez-Arche A, Quilez AM, Muriana FJG, Garcia-Gimenez MD, et al. Pharmacological effects of mitraphylline from *Uncaria tomentosa* in primary human monocytes: Skew toward M2 macrophages. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015;170:128–35. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874115003244>
118. Sheng Y, Bryngelsson C, Pero RW. Enhanced DNA repair , immune function and reduced toxicity of C-MED-100<sup>TM</sup> , a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *J Ethnopharmacol*. 2000;69:115–26.
119. Sheng Y, Li L, Holmgren K, Pero RW. DNA repair enhancement of aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* in a human volunteer study. 2001;8(4):275–82.

120. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: Validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods*. 2000;96(2):147–52.
121. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006;160(2):171–7.
122. Cheng A-C, Jian C-B, Huang Y-T, Lai C-S, Hsu P-C, Pan M-H. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2007;45(11):2206–18. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507001792%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17619071>
123. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(2):153–64.
124. Marzocco S, Adesso S, Alilou M, Stuppner H, Schwaiger S. Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Potential of the Root Extract and Constituents of *Doronicum austriacum*. *Molecules* [Internet]. 2017;22(6):1003. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/6/1003>
125. Menghini L, Leporini L, Pintore G, Ferrante C, Recinella L, Orlando G, et al. A Natural Formulation (IMOVIRAL™) Increases Macrophage

- Resistance to LPS-Induced Oxidative and Inflammatory Stress in vitro. *J Biol Regul Homeost Agents* [Internet]. 2014;28(4):775–82. Available from: <http://www.biolifesas.org/contentsJBRHA.htm>
126. Hsu HY, Wen MH. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J Biol Chem*. 2002;277(25):22131–9.
127. Wagner H. Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity (recent advances). *Pure Appl Chem*. 1990;62(7):1217–22.
128. Kosmider A, Czepielewska E, Kura? M, Gulewicz K, Pietrzak W, Nowak R, et al. *Uncaria tomentosa* Leaves Decoction Modulates Differently ROS Production in Cancer and Normal Cells, and Effects Cisplatin Cytotoxicity. *Molecules* [Internet]. 2017;22(4):620. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/4/620>
129. Tedesco S, Bolego C, Toniolo A, Nassi A, Fadini GP, Locati M, et al. Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* [Internet]. 2015;220(5):545–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.12.008>
130. Lemaire I, Assinewe V, Cano P, Awang DVC, Arnason JT. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Una de Gato). *J Ethnopharmacol*. 1999;64(2):109–15.

131. Rojas-Duran R, Gonzalez-Aspajo G, Ruiz-Martel C, Bourdy G, Doroteo-Ortega VH, Alban-Castillo J, et al. Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(3):801–4.
132. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature.* 2000;404(6776):407–11.
133. Syrjälä H, Surcel H-M, Ilonen J. Low CD4 / CD8 T lymphocyte ratio in acute myocardial infarction. *Clin Exp Immunol.* 1991;83:326–8.
134. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer.* 1999;86(8):1537–43.
135. Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4+FOXP3+ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2010;8(1):59–66. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cmi.2010.56>
136. Kulig P, Burkhard S, Mikita-Geoffroy J, Croxford AL, Hövelmeyer N, Gyölvézi G, et al. IL17A-mediated endothelial breach promotes metastasis formation. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(1):26–32.