

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA



Efecto de un extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (Uña de gato) (Willd. Ex Roem. & Schult) sobre las subpoblaciones de células dendríticas, moléculas accesorias (HLA-DR y CD86) y citoquinas Th1/Th2/Th17 e IL-12 provenientes de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama

Tíndara Paola Ysmodes Nastasi

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA**

LIMA-PERÚ

2013

Miembros del Jurado

Dr. Abraham Vaisberg Wolach

Presidente

Dra. Patricia Herrera Velit

Vocal

MsC. Rocío de María Inga Peña

Secretaria

Asesor

MsC. Iván Lozada Requena

Agradecimientos

Agradezco a la Empresa de Investigación y Desarrollo en Cáncer (EMINDES), al Dr. César Núñez Ponce por haber financiado la ejecución de este proyecto.

Índice

Abstract

Resumen

Abreviaciones

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivos Generales.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. Material y Métodos.....	15
3.1. Sujetos.....	15
3.2. Extracto hidroalcohólico de <i>Uncaria tomentosa</i> estandarizado al 5% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (UG-POA).....	16
3.3. Ensayos de laboratorio.....	16
3.3.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)....	16
3.3.2. Cultivo celular y grupos de tratamiento experimental.....	17
3.3.3. Citometría de flujo para determinación de DC.....	18
3.3.4. Medición de citoquinas Th1/Th2/Th17 por Cytometric Bead Array (CBA).....	19
3.3.5. Medición de IL-12 e IL6 por enzima inmunoensayo (ELISA).....	23
4. Análisis estadístico.....	25
5. Resultados.....	26

5.1. Determinación de las subpoblaciones de DCm y la expresión de sus moléculas accesorias (HLA-DR y CD86) por citometría de flujo.....	26
5.2. Determinación de las subpoblaciones de DCp y la expresión de sus moléculas accesorias (HLA-DR y CD86) por citometría de flujo.....	28
5.3. Medición de citoquinas Th1/Th2/Th17.....	31
6. Discusión.....	38
7. Conclusiones.....	45
8. Referencias Bibliográficas.....	47
9. Anexos.....	59
9.1. Formato de Consentimiento Informado.....	59
9.2. Citometría de flujo. Procedimiento de análisis de datos obtenidos con el software Summit 4.3.....	61
9.3. Preparación de reactivos para la medición de citoquinas Th1/Th2/Th17 por Cytometric Bead Array (CBA).....	62
9.4. Preparación de reactivos para la medición de IL-12 por enzima inmunoensayo (ELISA).....	64

Abstract

Uncaria tomentosa (cat's claw) (Willd. Ex Roem. & Schult) is a liana from the Peruvian Amazon and is used in traditional medicine for its immunomodulatory and anti-inflammatory properties. The present study used *in vitro* assays to investigate the immunomodulatory effects of a hydroalcoholic extract of *Uncaria tomentosa* with 5.03% pentacyclic oxindole alkaloid (UG-POA) on the immunophenotype of subsets of dendritic cells (DC), Th1, Th2, Th17 and IL-12 from the culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with breast cancer stage II and healthy controls. In all bioassays UG-POA concentrations between 50 to 1000 µg/mL were used.

Results: we demonstrate that UG-POA does not alter subpopulations and DC accessory molecules, however, in healthy controls there was a decrease in the percentage of DCm (myeloid) and an increase in HLA-DR and CD86 at 1000 µg/mL. Cytokine measurements show that UG-POA in both groups increased Th1 (IFN-γ and IL-2), Th2 (IL-4) and Th17 (IL-17) responses. IL-12 was only modulated in the group of healthy controls producing an increase of IL-12p70 and diminished IL-12p40 production.

Conclusions: UG-POA has a positive effect on the antitumor immune response at concentrations of 500 - 1000 µg/mL UG-POA, and is a promising natural product for use in preventive and alternative anti-cancer therapies.

Resumen

Uncaria tomentosa (Uña de gato) (Willd. Ex Roem. & Schult) es una liana de la Amazonía peruana y es utilizada por la medicina tradicional por sus propiedades inmunomoduladores y antiinflamatorias. El presente estudio utilizó ensayos *in vitro* para investigar los efectos inmunomoduladores de un extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* con 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (UG-POA) sobre el inmunofenotipo de subpoblaciones de células dendríticas (DC), citoquinas Th1, Th2, Th17 y IL-12 a partir del cultivo de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con cáncer de mama de estadio II y controles sanas. En todos los bioensayos se utilizaron concentraciones de UG-POA entre 50 – 1000 µg/mL.

Resultados: demostramos que UG-POA no altera las subpoblaciones y sus moléculas accesorias de DC; sin embargo, en los controles sanos se observó una disminución del porcentaje de DC_m (mieloides) y un aumento de HLA-DR y CD86 a 1000 µg/mL. La medición de citoquinas demuestra que UG-POA incrementa en ambos grupos las respuestas Th1 (IFN- γ y IL-2), Th2 (IL-4) y Th17 (IL-17). IL-12 solo fue inmunomodulada en el grupo de controles sanos produciéndose un incremento de IL-12p70 y una disminución de IL-12p40. **Conclusiones:** A las concentraciones de 500 – 1000 µg/mL UG-POA tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmune antitumoral y resulta un producto natural promisorio para el uso preventivo y alternativo en terapias anticancerígenas.

Abreviaciones

DC: Células dendríticas

DCm: Células dendríticas de origen mieloide

DCp: Células dendríticas de origen plasmacitoide

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

APC: Células presentadoras de antígenos

LT: Linfocitos T

LB: Linfocitos B

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

HLA-DR: Antígeno leucocitario humano, haplotipo DR

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

LTCD4⁺: Linfocitos T helper, "ayudadores"

LTCD8⁺: Linfocitos T citotóxicos, "efectores"

NK: Células natural killer

LTh1: Linfocitos T helper 1

LTh2: Linfocitos T helper 2

LTh17: Linfocitos T helper 17

CAMs: Moléculas de adhesión celular

UG: *Uncaria tomentosa* (Uña de gato)

POA: Alcaloides oxindólicos pentacíclicos

TOA: Alcaloides oxindólicos tetracíclicos

UG-POA: Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* estandarizado al 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos

ELISA: Enzima inmunoensayo

TA: Temperatura ambiente

IL-2: Interleuquina-2

IL-4: Interleuquina-4

IL-6: Interleuquina-6

IL-10: Interleuquina-10

TNF- α : Factor de Necrosis tumoral-alfa

IFN- γ : Interferón-gamma

IL-17A: Interleuquina-17A

IL-12: Interleuquina-12

IL-12p70: Interleuquina-12 subunidad p70

IL-12p40: Interleuquina-12 subunidad p40

1. Introducción

El cáncer es un problema de salud pública que lidera las principales causas de muerte a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2008 se produjeron 7,6 millones de muertes (cerca del 13% de las muertes a nivel mundial por esta causa). Cada año los principales tipos de cáncer con alta mortalidad son: pulmón (1,37 millones), estómago (736, 000), hígado (695, 000), colorrectal (608, 000) y mama (458, 000). Más del 70% de las muertes ocurren en países de ingresos bajos y medios. Para el 2030 se proyecta un incremento de muertes a nivel mundial por cáncer de 13,1 millones¹.

En Latinoamérica el cáncer ocupa el tercer lugar de las causas de muerte y en el Perú, el Registro de Cáncer de Lima Metropolitana, ha publicado tasas de incidencia y mortalidad por cáncer global la cual es de 150,7 y 78,3 por cien mil habitantes de nuestra ciudad capital. Para la oficina de informática del Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas el cáncer de mama ocupa el segundo lugar en las neoplasias más frecuentes en mujeres².

Según estas proyecciones el cáncer de mama podría convertirse en un problema de salud pública en el Perú, por lo que es necesario generar información a todo nivel de los posibles blancos que puedan servir para corregir esta neoplasia.

Sin lugar a dudas el cáncer se caracteriza por estar acompañado de un importante componente inmunológico, el cual todo el tiempo esta evitando que las células neoplásicas que aparecen se propaguen.³ Sin embargo, cuando éstas son capaces de evadirlo aparecen mecanismos más agresivos de respuesta.³ Por lo tanto, el cáncer y la

respuesta inmune conviven en una lucha constante que lamentablemente, en la mayoría de los casos, no es favorable para la persona que presenta el cuadro neoplásico.

Uno de los mecanismos más eficientes del sistema inmune se da a través de las células dendríticas (DC), las cuales forman parte de la inmunidad innata y adaptativa y cumplen un rol en la respuesta inmune que resulta clave para combatir infecciones por distintos patógenos y por supuesto, el cáncer. Asimismo, resulta importante en la participación de los comunicadores celulares por excelencia, es decir, las citoquinas, que permitirán que se lleve a cabo muchos mecanismos inmunológicos a partir del reconocimiento de las células neoplásicas.

Las DC se derivan de precursores ubicados en médula ósea, son muy heterogéneas ya que existen distintas subpoblaciones dependiendo del tejido donde se alojen y la función que cumplan⁴⁻⁶. Actualmente son herramientas útiles en los programas de terapia biológica como las vacunas de DC "cargadas" con antígenos tumorales *ex vivo* e *in vivo*⁴⁻¹¹ e incluso es posible obtener gran cantidad de DC *in vitro* para estudios sobre sus características inmunológicas¹²⁻¹⁶.

Las DC se denominan, junto con los macrófagos y los linfocitos B (LB), células presentadoras de antígeno (APC) por la gran capacidad de activar a los linfocitos T (LT) vírgenes y LT de memoria e iniciar la respuesta inmune. Las DC pueden estar en varios estadios de diferenciación y se las puede encontrar en circulación como DC de origen mieloide (DCm) y plasmacitoide (DCp)⁴⁻⁸, en órganos linfoides periféricos y en lugares donde ocurre la infección o donde se lleva a cabo una respuesta inmune como el ambiente tumoral⁹. Las DC en su estadio inmaduro tienen una gran capacidad de captura

de antígenos, la que culminará en su maduración con una alta expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (en inglés, major complex histocompatibility) (MHC) o también conocido como antígeno leucocitario humano (en inglés, human leukocyte antigen) (HLA-DR) en el humano, una molécula necesaria para la presentación de los antígenos a los LT (primera señal). Además existe un nivel de activación que se relaciona con la alta expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD83 y CD86, vitales para la activación de los LT (segunda señal). Asimismo, se requiere del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) debido a que esta citoquina no sólo sobre-regula la expresión de CMH-clase II sino también la expresión de CD80, CD83 y CD86^{17, 18}. Todo lo anterior induce a los LT a entrar en proliferación para luego diferenciarse en alguna de las subpoblaciones de linfocitos T helper, "ayudadores" (LTCD4⁺), o linfocitos T citotóxicos, "efectores" (LTCD8⁺), con determinadas funciones y perfiles de producción de citoquinas en el contexto de la inmunidad adaptativa o generará la tolerancia periférica, la cual es importante para evitar respuestas autoinmunes. Las DC también están involucradas en la activación de los linfocitos B (LB) a través de la producción de moléculas de activación (BAFF, B-cell activating factor belonging to TNF family) y supervivencia (APRIL, a proliferation-inducing ligand); de células natural killer (NK), activándolas e induciendo su expansión y de células NKT, induciéndolas a producir IFN- γ para generar resistencia a tumores, lo que demuestra su gran versatilidad^{10, 19-21}. La respuesta inmune antitumoral utiliza los mismos mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa descritos en la infección por

patógenos; sin embargo, en el presente estudio evaluaremos la acción de las DC y citoquinas inmunomoduladoras en el contexto de la inmunidad adaptativa.

Las causas de la aparición de un cáncer son diversas. Sin embargo, desde el punto de vista inmunológico una eficiente respuesta antitumoral innata inducirá por ejemplo apoptosis, con ello se generan restos antigénicos conformados por cuerpos apoptóticos o lisados de células tumorales que serán reconocidos por el sistema inmune adaptativo. Esto será inducido por las APC que pueden fagocitar estos cuerpos apoptóticos, especialmente el macrófago y la DC, pero también se encargarán del procesamiento, migración y presentación de antígenos tumorales específicos en los órganos periféricos a los LT, quienes a su vez son los encargados de ejecutar una respuesta de tipo LTh1 o de tipo LTh17. Estos LTh17 contribuyen a la respuesta antitumoral facilitando la quimioatracción de células inmunocompetentes hacia el microambiente tumoral, ya que IL-17 favorece la producción de IL-6, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y varias quimioquinas por células como los fibroblastos, células epiteliales y las mismas células neoplásicas por lo que cumpliría un rol pro-inflamatorio.^{11, 21, 22}

Aun así existe un nivel de evasión de la respuesta inmune por parte del cáncer; por ejemplo, se ha demostrado una alteración grave fenotípica y funcional de las DC en los pacientes con cáncer de mama debido a factores liberados por el tumor.^{15-19, 23} Estudios demuestran que las DC son incapaces de migrar a los nódulos linfoides debido a que factores liberados por el tumor como el factor transformante del crecimiento tipo beta (TGF- β), interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), alteran su diferenciación debido a que inducen una escasa expresión de moléculas del

CMH y co-estimuladoras con lo que la respuesta inmune citotóxica antitumoral antígeno específica no se lleva a cabo^{11, 21, 24}. Específicamente se ha demostrado que TGF- β producido por el tumor, puede favorecer indirectamente la metástasis al incrementar la producción o degradación de la matriz extracelular, induciendo la vascularización tumoral e inhibiendo los mecanismos de inmunovigilancia. Se han realizado ensayos exitosos con una proteína quimérica soluble compuesta por una porción del receptor tipo II de TGF- β y el fragmento Fc de una IgG1 murina (Fc:T β RII), la cual bloquea la unión de TGF- β a su receptor endógeno y como consecuencia produce diez veces menos metástasis pulmonar que el grupo control²⁴. Otro factor tumoral es VEGF (producido por células cancerígenas de mama y colon. Afecta la maduración funcional sólo de primeros estadios de las DC en sangre periférica, ya que incrementa el número de células madre CD34⁺, poseedoras del receptor Flt1 o VEGFR1 específico para VEGF. Estas células madre son incapaces de adquirir las características morfológicas típicas de una DC y tienen un bajo nivel de expresión de CMH-II y una capacidad reducida de captación de antígenos o una ineficiente presentación de antígenos resultando en una tolerancia inmune y privilegio inmune para las células tumorales en el hospedero²⁴⁻²⁶.

También se ha demostrado que en sangre las DC expresan niveles bajos de moléculas co-estimuladoras y también de interleuquina IL-12, además de mostrar un deterioro de la capacidad de estimular a LT^{16, 17, 20}. En este contexto, resulta importante mejorar la respuesta de las DC y la expresión de moléculas importantes a través de elementos que permitan contrarrestar la acción de los factores tumorales.

Otro mecanismo relacionado a la alteración de la maduración de las DC se relaciona con la inducción temprana de la maduración; sin embargo, es disfuncional ya que se pierde la capacidad inicial de captura de antígenos y de producción de citoquinas reguladoras. En este caso, las poliaminas, moléculas inmunomoduladoras endógenas, son los potenciales candidatos de esta alteración, debido a que son importantes mediadores de las funciones inmunes y aparecen en altas concentraciones en tejidos de proliferación activa. En particular, se sugiere que la espermina (poliamina) contribuiría a disminuir la respuesta anti-tumoral, habiéndose encontrado altos niveles en el plasma y orina de pacientes con cáncer de mama y además es capaz de inhibir la producción de IL-12 por macrófagos²⁸⁻³⁰.

Un estudio donde se realizó ensayos *ex vivo* con sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, confirmó que hay una reducción marcada de la subpoblación de DCm CD11c⁺, que presentan un inmunofenotipo maduro con sobre-expresión de CD86 y una deficiente producción de IL-12³¹. También se ha demostrado, *in vitro* que las DC, en presencia de espermina, reducen su capacidad para capturar antígenos y fagocitar células apoptóticas de una manera dosis dependiente³⁰.

En general, se sabe que gran parte de la respuesta inmune es mediada por las citoquinas, las que cumplen roles de mensajeros celulares facilitando que se lleven a cabo los mecanismos de proliferación, maduración, activación y regulación. Por ejemplo, las DC son capaces de producir IL-12 con lo que pueden direccionar una respuesta de tipo Th1 importante no sólo frente a infecciones por patógenos intracelulares sino también frente a células neoplásicas^{31, 32}. También se ha demostrado que IL-12 mejora la función y

promueve indirectamente la diferenciación y maduración de las DC a través de la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α , IL-6 y GM-CSF.³² Una falta de producción de IL-12 por las DC puede conducir a la muerte celular temprana.³³ Probablemente esta reducción de DC encontrada por Della et al., 2003³⁰ se deba a la inducción de apoptosis por parte de los factores tumorales o inmunosupresores como lo demostró Kiertscher et al., 2000²⁷, quienes determinaron que el efecto apoptótico de sobrenadantes de distintas líneas celulares cancerígenas, incluyendo las de cáncer de mama, es específico para DC²⁷. Además, Pinzon-Charry et al., 2006³⁴, encontraron que este efecto pro-apoptótico inducido por factores tumorales³³ presentes en el sobrenadante de líneas celulares de DC de cáncer de mama era revertido por estimulación con CD40 y el tratamiento con IL-12 exógena, lo que se evidencia con el aumento en la expresión de Bcl-2, una proteína anti-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2 e involucrada directamente en la apoptosis de DC inducida por factores tumorales³⁴.

Si bien es cierto que la IL-12 es importante, se debe tener en cuenta que existe una familia de IL-12 conformada además por IL-23 y IL-27, estructuralmente relacionados incluyendo la subunidad IL-12p40 y p19. El fragmento IL-12p40 es común a IL-12p70 y IL-23. Estudios recientes indican que IL-23 favorecería la producción de IL-17 por las células tumorales y que esto contribuiría a atraer leucocitos efectores al microambiente tumoral.³⁵ Por ello se debe evaluar en qué contribuye realmente cada una de estas citoquinas al momento de estudiar su comportamiento.

Actualmente, es sabido que el paradigma Th1/Th2 no existe más y que más bien han sido descubiertas más subpoblaciones de LTh (Th1, Th4, Th9, Th22, iTreg, nTreg, entre otras) que tienen un rol importante en la respuesta antitumoral. Las células inflamatorias y sus moléculas pueden tener un papel fundamental en la iniciación y el mantenimiento de la inmunidad antitumoral de protección. Los linfocitos T helper 17 (Th17) son un componente inflamatorio importante y se ha demostrado que promueven la inflamación en una serie de enfermedades autoinmunes³⁶⁻⁴³. Recientemente, las células Th17 se han investigado en pacientes con diversos tipos de cáncer, siendo uno de ellos el cáncer de mama. En general se acepta que, si bien las células Th17 pueden permanecer como una menor población en sangre periférica de pacientes con cáncer, pueden presentarse en una mayor proporción en el lugar mismo donde se encuentra localizado el tumor⁴³. Las células T efectoras convencionales a menudo expresan HLA-DR, CD25 y granzima B, pero se ha demostrado, que en cuanto a las células Th17 localizadas cerca al tumor, estas expresan niveles insignificantes de estas moléculas. Esto sugiere que estas células Th17 podrían no ser células T efectoras convencionales. Además, expresan niveles mínimos de PD1 (programmed cell death 1) y Foxp3 (forkhead box P3), lo cual sugiere que no contribuyen a la inmunosupresión en el microambiente tumoral^{44, 45}.

En lo que concierne al patrón de citoquinas que liberan las células Th17 se ha observado que expresan niveles insignificantes de la citoquina antiinflamatoria IL-10, pero alrededor del 50-90% de las células Th17 producen altos niveles de citoquinas efectoras como la IL-2, GM-CSF, IFN- γ y TNF.⁴⁴ Las células Th17 asociadas a tumores exhiben un perfil de citoquinas de células T efectoras similar al que se ha descrito de las células

T efectoras en enfermedades infecciosas.^{46, 47} Este perfil de citoquinas se ha observado en células Th17 asociadas con distintos tipos de tumores humanos, en donde se incluye distintos carcinomas de piel, intestino páncreas, hígado y ovario.⁴⁵ Estos datos indicarían que estas células Th17 pueden tener un papel protector en la inmunopatología del tumor mediante la promoción de la inmunidad antitumoral. Sin embargo, la relación entre éstas y la inmunopatología del tumor es aún de índole controversial.⁴⁸⁻⁵⁰

Hay varias líneas de evidencia que sugieren que las células Th17 pueden promover respuestas protectoras inmunes antitumorales. En primer lugar, células Th17 infiltradas en el tumor expresan varias citoquinas efectoras, similar a lo observado en pacientes con enfermedades infecciosas.^{46, 47} Esto sugiere que las células Th17 asociadas a tumores podrían ser células T efectoras funcionales, y de acuerdo con esta posibilidad, las células Th17 se correlacionan negativamente con la presencia de LTreg^{44, 51} y se correlacionan positivamente con las células efectoras inmunes, incluyendo células T efectoras IFN- γ ⁺, LT CD8⁺ y NK, en el microambiente del tumor mismo.⁴⁴ Estas observaciones son compatibles con los datos de los tumores tanto de humanos así como de ratón^{45, 52, 53} La actividad antitumoral mediada por células Th17 también podría estar relacionada con el reclutamiento de DC en el microambiente del tumor o tumores en ganglios linfáticos. Las células Th17 pueden estimular la expresión de CCL20 en los tejidos tumorales y promover el tráfico DC tumorales de modo dependiente de CCL20-CCR6. A su vez, los LT CD8⁺ son efectivamente preparados y activados por las DC y consecuentemente median una respuesta inmune antitumoral potente. En conjunto, estos datos sugieren que las células Th17 no pueden mediar la actividad antitumoral de modo directo, sino que

más bien pueden promover la inmunidad antitumoral indirectamente a través del reclutamiento de DC y las células citotóxicas efectoras.⁵²

Todos estos mecanismos inmunológicos hoy en día son abordados por inmunólogos de todas partes del mundo habiéndose creado terapias biológicas que acompañan a los tratamientos convencionales para el cáncer. Si bien es cierto que estas terapias biológicas apuntan a blancos específicos del sistema inmune o de las células neoplásicas resultan ser demasiado costosas por el momento como para ser utilizadas de manera masiva en países en vías de desarrollo como Perú. Aun así las terapias biológicas logran resultados parciales cuyo principal logro a destacar es la mejora en la calidad de vida del paciente; por lo que uno de los objetivos de muchos investigadores es apuntar hacia los productos naturales, que podrían tener un potencial anticancerígeno importante, el cual merece ser evaluado y comprobado científicamente por aquellas propiedades que en el uso popular se les atribuye.

Se conoce que una gran variedad de plantas medicinales han demostrado tener potencial para ser usadas en el abordaje de diferentes patologías. Sin embargo, a pesar del empirismo hay que demostrar su utilidad, debido a que los efectos benéficos de una planta medicinal no pueden ser atribuidos a un principio activo particular único como si ocurre con los medicamentos químicos.

A las plantas con acción terapéutica se les atribuye, desde un punto de vista popular, grandes virtudes que han sido transmitidas de manera oral de generación en generación. Sin embargo, es necesario demostrar con resultados científicamente válidos sus propiedades atribuidas tradicionalmente⁵³. Por ejemplo, Chang y col.⁵⁴ determinaron el

efecto inmunomodulador de *Tripterygium wilfordii*, una planta de China, cuyo extracto refinado del xilema de la raíz ha demostrado científicamente inhibir la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) sobre células endoteliales en cultivo, lo que se ha planteado que podría explicar su efecto anti-inflamatorio observado en artritis reumatoide (AR).

La uña de gato (UG), *Uncaria tomentosa* Willd DC, es una planta de la Amazonía peruana de uso milenario por las tribus Aguaruna, Asháninka, Cashibo, Conibo y Shipibo. Los Asháninka la llaman Savéntaro (saveshi = planta, antearo = potente) y la utilizan para tratar asma e inflamaciones del tracto urinario; mientras que las tribus indígenas de Piura la utilizan para tratar tumores, inflamaciones y reumatismo⁵⁶⁻⁵⁸.

Su composición química es variada incluyendo glicósidos del ácido quínovico, esteroides, fenoles, triterpenos polihidroxilados, flavonoides, proantocianidinas, catequinas, saponinas, taninos y alcaloides. Estos últimos han permitido la clasificación en dos quimiotipos: uno con mayor contenido de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (POA), y otro con una concentración más alta de tetracíclicos (TOA); sin embargo, no se produce un patrón uniforme de POA y TOA, pudiendo variar dependiendo si se obtienen la corteza, las hojas o las raíces e incluso dependerá de la estación del año en que se recolecte la planta^{56, 59-62}. Se sugiere que la actividad biológica se debería a la combinación de otros compuestos que actuarían en sinergismo, o como vehículos o inducidos por los POA. Los POA: pteropodina, isopteropodina, mitrafilina e isomitrafalina, extraídos de *Uncaria tomentosa* inhiben la vía de las protein tirosin kinasas (PTK) (importantes para la división y diferenciación celular y apoptosis) y

serían los responsables de la citotoxicidad ejercida por inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer de pulmón humanas MB-MDA-231⁶³.

In vitro, 11 extractos de UG (100µg/mL) produjeron entre 27% y 59% de actividad anti-mutagénica ante 8-MOP (8-metoxi-psoralen) y radiación UV en cepas de *Salmonella typhimurium* mediante la supresión de oxígeno y eliminación de oxi-radicales generados por el estímulo mutagénico⁶⁴. La primera evidencia de propiedades anti-tumorales se determinó con un extracto acuoso de UG (C-Med-100TM, un producto prácticamente libre de alcaloides), que inhibió la proliferación celular en líneas leucémicas y de linfoma B humanas a través de la inducción de apoptosis⁶⁵. Este mismo producto ha demostrado un mejoramiento de la función inmune, actividad anti-inflamatoria y reparación del ADN en ratas y piel humana^{66, 67}.

Además de la demostrada actividad anti-inflamatoria de UG⁶⁸⁻⁷¹, también se ha demostrado que el extracto hidroalcohólico de UG ejerce un efecto modulador sobre las DC tanto mieloides como plasmocitoides y sobre sus moléculas co-estimuladoras⁷²⁻⁷⁵.

Además, un estudio diseñado para investigar los efectos de un extracto de alcaloides oxindol pentacíclico de la corteza de UG sobre el fenotipo de linfocitos, la producción de citoquinas Th1/Th2, la proliferación celular y citotoxicidad, *in vivo* y en experimentos inmunotóxicos inmunomoduladores *in vitro*, obtuvo como resultados más resaltantes: el aumento de la celularidad de la pulpa esplénica blanca y la médula tímica y el aumento del número de linfocitos T y linfocitos B; un gran efecto estimulador sobre la viabilidad de los linfocitos y la polarización inmunológica hacia un perfil de citoquinas Th2.⁷⁶

El presente estudio evaluó el efecto inmunomodulador de la UG sobre DC y citoquinas involucradas en la respuesta anti-tumoral en cáncer de mama, debido a que es una de las neoplasias en las que se ha investigado mucho más la participación de las DC y las moléculas que permiten su desarrollo en la respuesta anti-tumoral.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar la actividad inmunomoduladora de un extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato) (Willd. Ex Roem. & Schult) (UG) en subpoblaciones de células dendríticas y sus moléculas accesorias y sobre la producción de citoquinas Th1/Th2/Th17 e IL-12 a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con cáncer de mama.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Determinar el porcentaje de las subpoblaciones de células dendríticas DCm (CD11c⁺HLA-DR⁺) y DCp (CD123⁺HLA-DR⁺) y sus moléculas de maduración (HLA-DR) y activación (CD86), respectivamente, en PBMC de pacientes con cáncer de mama estadio II luego del tratamiento *in vitro* con UG.

2.2.2. Determinar el nivel de citoquinas Th1/Th2/Th17 e IL-12 (IL-12p70 y IL-12p40) en el sobrenadante de cultivo de PBMC de pacientes con cáncer de mama estadio II luego del tratamiento *in vitro* con UG.

3. Materiales y Métodos

3.1. Sujetos

Se captaron 11 mujeres sanas (diagnóstico negativo de adenocarcinoma mamario) (46.6 ± 9.11 años) y 8 mujeres con cáncer de mama en estadio II (54.75 ± 12.74 años), las cuales donaron de manera voluntaria muestras de sangre periférica (36mL) previa firma de un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código de inscripción 57825) (Ver anexo 9.1).

Las mujeres sanas fueron incluidas siempre y cuando tuvieran mamografía negativa y que no hayan tenido alguna enfermedad en los últimos 6 meses.

Las mujeres con cáncer de mama fueron incluidas según los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- Criterios de inclusión:
 - Diagnóstico histológicamente confirmado de adenocarcinoma mamario (Estadio II)

- Criterios de exclusión:
 - Haber recibido quimioterapia y/o radioterapia
 - Haberse sometido a cirugía (por cáncer de mama)
 - Haber tenido algún otro tipo de cáncer previo
 - Sufrir de alguna inmunodeficiencia y/o enfermedad autoinmune
 - Estar recibiendo algún citostático en los últimos 12 meses

3.2. Extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* estandarizado al 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (UG-POA)

Se utilizó un extracto hidroalcohólico obtenido a partir de la corteza de *Uncaria tomentosa*, en forma de un polvo fino color marrón rojizo, proporcionado por PERUVIAN HERITAGE SA y contenía 5,03% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (UG-POA). Este contenido ha sido determinado por HPLC según lo indicado por Dreifuss AA et al, 2010⁷⁷. Se preparó una solución stock de UG-POA a partir del polvo fino pesando 30g del polvo, el que se agregó a un matraz de 5L y se diluyó en 1L de agua bidestilada, dejándola hervir por 30 minutos. Se obtuvo entonces una solución color vino con restos sólidos visibles después de dejar en reposo la solución. Una vez fría se decantó la solución, luego fue filtrada dos veces en papel Whatman N°3 y finalmente microfiltrada en cabina de flujo laminar con filtro de 0,22µm. De este último filtrado se obtuvo una solución más clara y de color naranja pálido (solución stock), la cual se conservó a -70°C.

3.3. Ensayos de Laboratorio

3.3.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

A partir de la obtención de muestras de sangre periférica fresca (36mL) por donante voluntaria se realizó el aislamiento de PBMC mediante la técnica de gradiente de centrifugación con Histopaque 1,077g/mL (Sigma, St Louis, MO, USA). Previamente, se preparó tubos de polipropileno con 10mL 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 (30mL) al tubo que contiene el Histopaque. 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. Se lavó dos veces con 40mL 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 realizaron los cálculos para obtener la cantidad de células necesarias a ensayar.

3.3.2. Cultivo celular y grupos de tratamiento experimental

Las PBMC obtenidas fueron inmediatamente cultivadas en medio RPMI-1640 completo (Sigma, St Louis, MO, USA) con suero bovino fetal al 10% (Hyclone), penicilina 100U/mL y estreptomycinina 100µg/mL (Sigma, St Louis, MO, USA). Se cultivaron 100µL de suspensión para obtener una concentración final de 1×10^6 PBMC/pozo en tubos de citometría. Seguidamente se establecieron los siguientes grupos de tratamiento, tanto para las pacientes Estadio II como para las Sanas, y se incubaron a 37°C, con 5% CO₂ por 2h:

Grupo 1. PBMC tratadas solamente con el vehículo diluyente de UG-POA (agua destilada);

Grupo 2. PBMC tratadas con el vehículo diluyente y estimuladas con LPS (1µg/mL);

Grupo 3. PBMC tratadas con UG-POA (50µg/mL), estimuladas con LPS; tanto para las pacientes Estadio II como para las Sanas.

Grupo 4. PBMC tratadas con UG-POA (500µg/mL), estimuladas con LPS; tanto para las pacientes Estadio II como para las Sanas.

Grupo 5. PBMC tratadas con UG-POA (1000µg/mL), estimuladas con LPS; tanto para las pacientes Estadio II como para las Sanas.

Luego de culminar el periodo de 2h de incubación, se procedió a añadir 50µL de LPS y se incubó nuevamente a 37°C, con 5% CO₂ hasta el día siguiente.

3.3.3. Citometría de flujo para determinación de DC y sus moléculas accesorias

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que permite medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz y se les marca con anticuerpos monoclonales unidos a sustancias fluorocromas.

Se utilizó una suspensión celular de 100µL PBMC (5×10^5) para cada tubo en 5 tubos estériles de citometría.

Para la determinación del porcentaje de células dendríticas y la intensidad de fluorescencia media (IFM) de las moléculas HLA-DR y CD86, las suspensiones celulares fueron marcadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: Anti-Lin1-FITC (7µL) (Cat No. 340546), Anti-HLA-DR-PerCP (5µL) (Cat No. 347364), Anti-CD11c-APC (5µL) (Cat No.340544), Anti-CD123-APC (5µL)

(Cat No. 560087), Anti-CD86-PE (5 μ L) (Cat No. 555658) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Los anticuerpos Anti-CD11c-APC y Anti-CD123-APC fueron agregados a distintos tubos de ensayo, según el tipo de célula dendrítica que se desea medir DCm o DCp, respectivamente. Todos los tubos fueron incubados por 30 minutos a 2-8°C, se lavaron dos veces con 1mL de Cell wash (solución de lavado celular, 1% suero fetal bovino en PBS (pH 7,4)) a 1800rpm por 5 minutos, repitiéndose este paso 2 veces. Finalmente, los sedimentos celulares fueron resuspendidos con 500 μ L de Cell fix (1% paraformaldehído en PBS pH 7,4) y guardados a 4°C hasta su lectura.

La adquisición de los datos se realizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, USA). El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software Summit 4.3 (Dako Colorado, Inc., USA) (Ver anexo 9.2).

3.3.4. Determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17 por Cytometric Bead Array (CBA)

El ensayo CBA es una variante de la citometría de flujo que emplea beads (también llamadas perlas), de distintos tamaños revestidas con una fracción de anticuerpos contra una citoquina determinada. Luego de la unión de ambas otro anticuerpo marcado con un fluorocromo (Ficoeritrina o PE) se une a la citoquina formando de este modo un complejo que pasa por la celda de detección del citómetro de flujo, que cuenta con un láser que incide sobre el complejo. Luego es posible medir la intensidad de fluorescencia media (IFM) y a través de curvas estándar (Ver anexo 9.3) y determinar la concentración de cada una de ellas.

Se utilizó un kit de CBA para la detección de citoquinas humanas Th1/Th2/Th17 (BD, San José CA, USA), para medir los niveles de las siguientes citoquinas: interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-10 (IL-10), Factor de Necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interferón-gamma (IFN- γ) e interleuquina-17A (IL-17A) en una sola muestra de sobrenadante de cultivo de PBMC. El rendimiento del kit ha sido optimizado para el análisis de las concentraciones fisiológicamente relevantes (niveles en pg/ml).

Para el ensayo se procedió a coleccionar del sobrenadante de cultivo de cada uno de los 5 grupos de los cultivos de PBMC y se realizó al ensayo de CBA para la detección de citoquinas Th1 (IL-2, TNF, IFN- γ); Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) y Th17 (IL-17), siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron diluidas 1/16, tanto del grupo Sanas como del grupo de Estadio II.

Antes de comenzar con el ensayo:

- Se prepararon los estándares siguiendo los pasos mencionados a continuación:
 1. Se reconstituyó el estándar 15 minutos antes de realizarse las diluciones en cabina de flujo laminar (Ver anexo 9.3), con 2mL del diluyente del estándar. Se le dejó equilibrar durante al menos 15 minutos antes de hacer las diluciones. Se vortexeo para mezclar.
 2. Se agregó 300 μ l 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:

TUBO	CONCENTRACIÓN (pg/mL)	DILUCIÓN DEL STANDARD DE LA CITOQUINA
1	0 (Control negativo)	No dilución del Standard (Solo 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	1,250	1:4
9	2,500	1:2
10	5,000	Top standard

3. Se realizaron diluciones seriadas añadiendo 300µL de cada estándar al tubo siguiente (Ver anexo 9.3). Vortexear para mezclar entre cada transferencia. El tubo con el estándar no diluido sirvió como la concentración del estándar más alto. El diluyente del estándar sirvió como la concentración cero (0pg/ml).
 - Se mezclaron los beads siguiendo los pasos mencionados a continuación:
 - 1) Se determinó el número de tubos de ensayo (incluyendo estándares y controles) necesarios para el ensayo, teniendo un total de 124 tubos.
 - 2) Se vortexeo fuertemente cada tubo con la suspensión de beads de captura de 3 a 5 segundos antes de mezclarlos con las muestras.
 - 3) Se agregó una alícuota de 10µL de cada uno de los beads de captura y se vortexeo la mezcla.

- Para la realización propia del ensayo se siguieron los siguientes pasos:
 - 1) Se mezclaron los beads de captura, de los cuales se agregaron solamente 50 μ L a cada tubo de ensayo.
 - 2) Se añadió 50 μ L de las diluciones del estándar de las citoquinas Th1/Th2/Th17 a los tubos utilizados como controles.
 - 3) Se añadió 50 μ L de cada muestra a los tubos respectivos.
 - 4) Se agregó 50 μ L del reactivo de detección de las citoquinas humanas Th1/Th2/Th17 a todos los tubos de ensayo.
 - 5) Se incubaron los tubos de ensayo durante 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz.
 - 6) Se añadió 1mL del buffer de lavado a cada tubo de ensayo y se centrifugó a 200g durante 5 minutos.
 - 7) Con cuidado se aspiró y descartó el sobrenadante de cada tubo de ensayo.
 - 8) Finalmente, se añadió 300 μ L de solución de lavado a cada tubo de ensayo para re-suspender el sedimento de los beads.

La adquisición de datos se realizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur, dentro de las 24 horas post ensayo y los resultados fueron analizados por el software BD™ Cytometric Bead Array Software, versión 1.4.

3.3.5. Medición de IL-12 por enzima inmunoensayo (ELISA)

El ensayo de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) es una prueba de fase sólida tipo sándwich, sea para IL-12 (p40) o IL-12 (p70), el cual utiliza un anticuerpo monoclonal específico para la citoquina deseada de detectar recubierta por una placa de 96 pocillos.

Se utilizó un kit ELISA (EIAOpt BDBiosciences, San Diego, CA, USA) para la determinación cuantitativa in vitro de la IL-12 (p40) e IL-12(p70) en sobrenadante de cultivo celular.

Siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante se procedió a realizar los pasos detallados a continuación:

- 1) Preparación del estándar: 15 minutos antes de empezar el ensayo se reconstituyó el estándar y se realizó las diluciones seriadas en el diluyente de ensayo (Ver anexo 9.4).
- 2) Se revistieron los pocillos con 100 μ L del anticuerpo de captura (anti-citoquina) diluido en Buffer de revestimiento (1/250).
- 3) Se descartó el excedente y se lavó 3 veces con 300 μ L/pozo de solución de lavado (Ver anexo 9.4).
- 4) Los pocillos se bloquearon con 200 μ L/pozo de diluyente de ensayo y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente.
- 5) Se repitió el paso 3.
- 6) Se agregaron 100 μ L de cada estándar y muestra problema en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se selló y se llevó a incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

- 7) Se repitió el paso 3 pero se lavó 5 veces.
- 8) Se agregó 100 μ L de anticuerpo de detección (diluido 1/250), preparado 15 minutos antes de su uso (Ver anexo 9.4), a cada pozo, se selló la placa y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.
- 9) Se repitió el paso 3 pero se lavó 7 veces esperando de 30 segundos a 1 minuto entre cada lavado.
- 10) Se agregó 100 μ L de sustrato a cada pozo y se procedió a incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- 11) Se agregó 50 μ L de solución Stop a cada pocillo y se leyó a 450nm dentro de los primeros 30 minutos.

4. Análisis estadístico

Los resultados son presentados como el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media). El análisis estadístico fue realizado con el software STATISTICA (data analysis software system) versión 7, statsoft.Inc (2004). Las comparaciones entre grupos fueron hechas por el análisis de varianza ANOVA factorial y one-way ANOVA y solo cuando $p < 0,05$ se realizaron comparaciones de medias Pos hoc con el test de Fisher. Un valor de probabilidad menor de 0,05 ($p < 0,05$) y 0,001 ($p < 0,001$) fueron considerados estadísticamente significativos.

5. Resultados

5.1. Determinación de las subpoblaciones de DCm y la expresión de sus moléculas accesorias (HLA-DR y CD86) por citometría de flujo

Para la determinación de las subpoblaciones de las DCm y la expresión de sus moléculas accesorias tanto HLA-DR como CD86 se utilizó una suspensión celular de 5×10^5 PBMC. Se utilizaron los grupos que fueron especificados en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos muestran en el grupo Sanas, una disminución dosis dependiente en el porcentaje de DCm que se hizo significativa ($p < 0,001$) a $500 \mu\text{g/mL}$ y $1000 \mu\text{g/mL}$ (Figura 1). En el caso del grupo Estadio II aunque se observa una disminución del porcentaje de DCm esta no fue estadísticamente significativa (Figura 1). Cuando evaluamos la expresión de las moléculas HLA-DR y CD86 en la población de DCm se observó en el grupo Sanas un aumento significativo ($p < 0,01$) con respecto al control con LPS para ambas moléculas a la concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$ (Figuras 2 y 3); mientras que en el grupo Estadio II no se observó ninguna modificación en la expresión de estas moléculas a las concentraciones ensayadas (Figura 2 y 3).

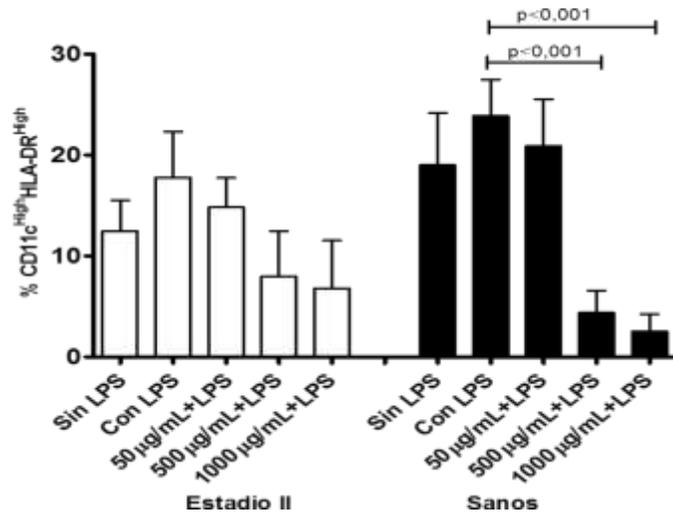


Figura 1. Efecto de UG-POA sobre el porcentaje de DC mieloides (CD11c^{High}HLA-DR^{High}). Estadio II, pacientes con cáncer de mama en estadio II y Sanos, personas con mamografía negativa. Se cultivaron $0,5 \times 10^6$ PBMC/tubo, las cuales fueron tratadas por 2h con UG-POA (50, 500 y 1000µg/mL), excepto los grupos Sin y Con LPS que recibieron el vehículo diluyente. Luego todos los grupos, excepto el grupo Sin LPS fueron estimulados con LPS (1µg/mL) por 24h. Finalmente, se realizó el marcaje con anticuerpos específicos, se adquirieron los datos por citometría de flujo y se obtuvieron los porcentajes celulares por análisis con el software Summit 4.3. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 8 CAMA y 11 Sanas. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$.

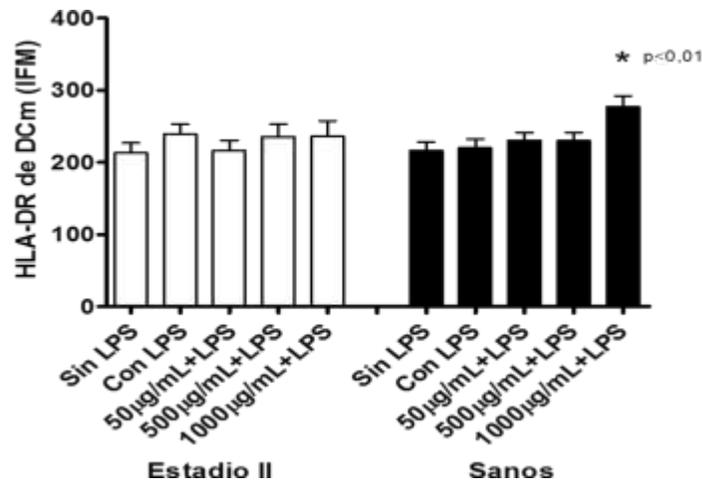


Figura 2. Efecto de UG-POA sobre la expresión de HLA-DR en DC mieloides. Estadio II, pacientes con cáncer de mama en estadio II y Sanos, personas con mamografía negativa. Se cultivaron $0,5 \times 10^6$ PBMC/tubo, las cuales fueron tratadas por 2h con UG-POA (50, 500 y 1000µg/mL), excepto los grupos Sin y Con LPS que recibieron el vehículo diluyente. Luego todos los grupos, excepto el grupo Sin LPS fueron estimulados con LPS (1µg/mL) por 24h. Finalmente, se realizó el ensayo de citometría de flujo y el análisis con el software Summit 4.3. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 8 CAMA y 11 Sanas. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si * $p < 0,05$. IFM= Intensidad de Fluorescencia Media.

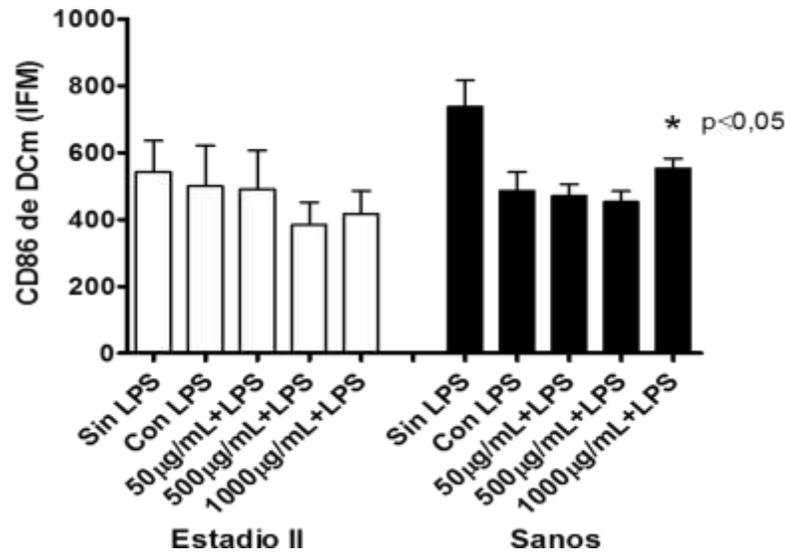


Figura 3. Efecto de UG-POA sobre la expresión de CD86 en DC mieloides. Estadio II, pacientes con cáncer de mama en estadio II y Sanos, personas con mamografía negativa. Se cultivaron $0,5 \times 10^6$ PBMC/tubo, las cuales fueron tratadas por 2h con UG-POA (50, 500 y $1000 \mu\text{g/mL}$), excepto los grupos Sin y Con LPS que recibieron el vehículo diluyente. Luego todos los grupos, excepto el grupo Sin LPS fueron estimulados con LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Finalmente, se realizó el ensayo de citometría de flujo y el análisis con el software Summit 4.3. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 8 CAMA y 11 Sanas. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si * $p < 0,05$. IFM= Intensidad de Fluorescencia Media.

5.2. Determinación de las subpoblaciones de DCp y la expresión de sus moléculas accesorias (HLA-DR y CD86) por citometría de flujo

Para la determinación de las subpoblaciones de las DCp y la expresión de sus moléculas accesorias tanto HLA-DR como CD86 se utilizó una suspensión celular de 5×10^5 PBMC. Se utilizaron los grupos que fueron especificados en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos muestran tanto en el grupo Sanas como en el grupo Estadio II, que los porcentajes de DCp no se modifican y que aunque a $1000 \mu\text{g/mL}$ se observa una aparente disminución está no tuvo significancia estadística (Figura 4).

Cuando evaluamos la expresión de las moléculas HLA-DR y CD86 en la población de DCp se observó en el grupo Sanos un aumento significativo ($p < 0,05$) con respecto al control con LPS para la molécula accesoria HLA-DR a la concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$ (Figuras 5); mientras que para la molécula accesoria CD86 no se observó ninguna modificación significativa en la expresión a las concentraciones ensayadas (Figura 6).

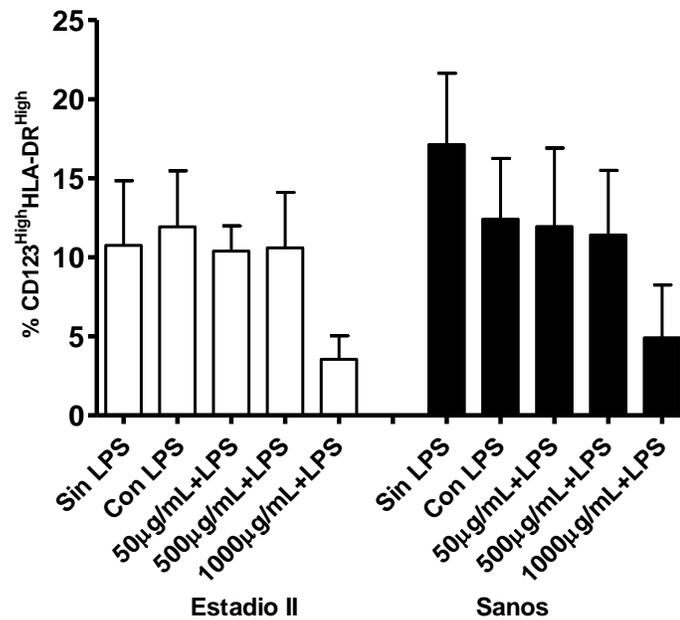


Figura 4. Efecto de UG-POA sobre el porcentaje de DC plasmocitoides (CD11c^{High}HLA-DR^{High}). Estadio II, pacientes con cáncer de mama en estadio II y Sanos, personas con mamografía negativa. Se cultivaron $0,5 \times 10^6$ PBMC/tubo, las cuales fueron tratadas por 2h con UG-POA (50, 500 y $1000 \mu\text{g/mL}$), excepto los grupos Sin y Con LPS que recibieron el vehículo diluyente. Luego todos los grupos, excepto el grupo Sin LPS fueron estimulados con LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Finalmente, se realizó el marcaje con anticuerpos específicos, se adquirieron los datos por citometría de flujo y se obtuvieron los porcentajes celulares por análisis con el software Summit 4.3. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 8 CAMA y 11 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$.

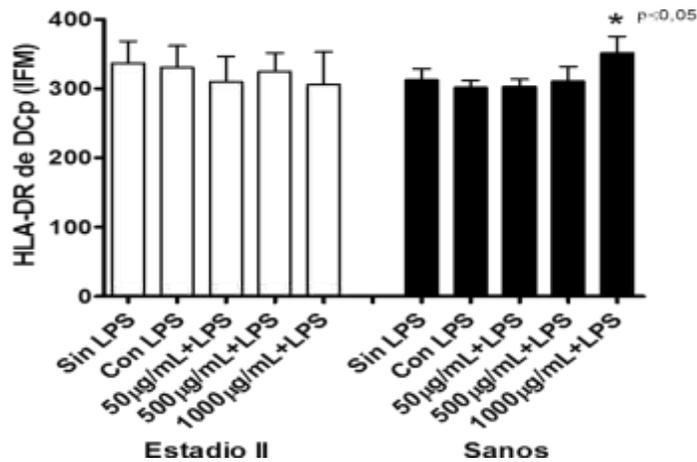


Figura 5. Efecto de UG-POA sobre la expresión de HLA-DR en DC plasmocitoides. Estadio II, pacientes con cáncer de mama en estadio II y Sanos, personas con mamografía negativa. Se cultivaron $0,5 \times 10^6$ PBMC/tubo, las cuales fueron tratadas por 2h con UG-POA (50, 500 y $1000 \mu\text{g/mL}$), excepto los grupos Sin y Con LPS que recibieron el vehículo diluyente. Luego todos los grupos, excepto el grupo Sin LPS fueron estimulados con LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Finalmente, se realizó el ensayo de citometría de flujo y el análisis con el software Summit 4.3. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 8 CAMA y 11 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si * $p < 0,05$. IFM= Intensidad de Fluorescencia Media.

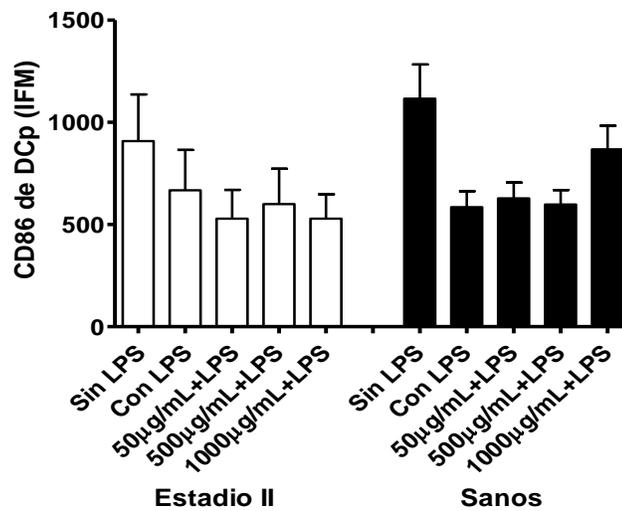


Figura 6. Efecto de UG-POA sobre la expresión de CD86 en DC plasmocitoides. Estadio II, pacientes con cáncer de mama en estadio II y Sanos, personas con mamografía negativa. Se cultivaron $0,5 \times 10^6$ PBMC/tubo, las cuales fueron tratadas por 2h con UG-POA (50, 500 y $1000 \mu\text{g/mL}$), excepto los grupos Sin y Con LPS que recibieron el vehículo diluyente. Luego todos los grupos, excepto el grupo Sin LPS fueron estimulados con LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Finalmente, se realizó el ensayo de citometría de flujo y el análisis con el software Summit 4.3. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 8 CAMA y 11 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si * $p < 0,05$. IFM= Intensidad de Fluorescencia Media.

5.3. Medición de citoquinas Th1/Th2/Th17

Para la detección de citoquinas Th1/Th2/Th17 (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17) se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de los grupos con los cuales se realizó el ensayo de CBA siguiendo los pasos previamente explicados (Ver 3.3.4).

Citoquinas Th1

En ambos grupos, Estadio II y Sanos los niveles de IFN- γ mostraron un aumento dosis dependiente que se hace estadísticamente significativo a partir de 500 μ g/mL ($p < 0,001$) de UG-POA con respecto al control con LPS. En este caso también se observó que el grupo de Sanos produjo mayores niveles de IFN- γ que los sujetos del grupo Estadio II (Figura 7).

En ambos grupos, Estadio II y Sanos los niveles de IL-2 muestran un aumento dosis dependiente que se hace estadísticamente significativo ($p < 0,05$) a 1000 μ g/mL de UG-POA con respecto al control con LPS (Figura 8). Cuando se evaluaron los niveles de TNF- α por el método de CBA estos sobrepasaron en todos los grupos los 5000pg/mL (Figura 9) por lo que no fue posible determinar los niveles de esta citoquina por falta de muestra para otro ensayo.

Citoquinas Th2

En ambos grupos, Estadio II y Sanos los niveles de IL-4 muestran un aumento dosis dependiente que es estadísticamente significativo ($p < 0,05$) a 1000 μ g/mL de UG-POA con respecto al control con LPS. Además, se puede destacar que los sujetos Sanos producen mayores niveles de IL-4 que los sujetos del grupo Estadio II (Figura 10).

Cuando evaluamos los niveles de IL-6 no encontramos diferencias ante las distintas concentraciones de UG-POA evaluadas en ninguno de los grupos (Figura 11).

Los niveles de IL-10 no mostraron ninguna variación con respecto al control con LPS a las concentraciones de UG-POA evaluadas. Aunque en el grupo de Sanos se puede observar una tendencia dosis dependiente a incrementar los niveles de IL-10 esta no fue estadísticamente significativa y destacamos el hecho de que exista una mayor concentración en el grupo de Sanos que en el grupo Estadio II (Figura 12).

Citoquinas Th17

Cuando comparamos los niveles de IL-17A con respecto al control sin LPS observamos que el grupo con LPS disminuyó los niveles de esta citoquina; sin embargo, tras el tratamiento con UG-POA observamos un incremento dosis dependiente de los niveles de IL-17A que se hacen significativos a partir de 500µg/mL para el grupo Estadio II ($p<0,05$) y 1000µg/mL para el grupo Sanos ($p<0,01$) (Figura 13). Estos niveles de IL-17A llegan a concentraciones por encima de los controles utilizados sobretodo a 1000µg/mL.

Citoquinas IL-12p70 e IL-12p40

En el grupo Estadio II no encontramos diferencias en los niveles de IL-12p70 a las concentraciones evaluadas; sin embargo, en el grupo Sanas encontramos un incremento dosis dependiente de IL-12p70 que fue significativo a 1000 µg/mL ($p<0,05$) (Figura 14).

Los niveles de IL-12p40 en ambos grupos mostraron un disminución dosis dependiente que fue significativa solo en el grupo Sanas a 1000 µg/mL ($p<0,05$) (Figura 15).

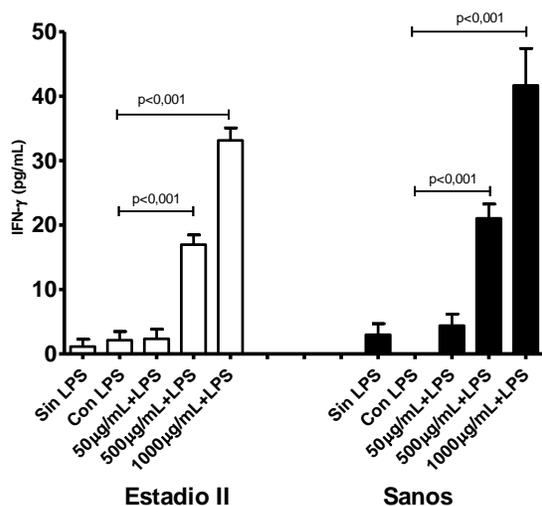


Figura 7. **Medición de los niveles de IFN- γ (pg/mL).** Las PBMC ($0,5 \times 10^6$ cél/ml) de personas con adenocarcinoma mamario en estadio II (Estadio II) y personas sanas (Sanos) fueron cultivadas por 2h con o sin UG-POA y estimuladas con o sin LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se midió por CBA los niveles de citoquinas. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 6 Estadio II y 5 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$ (* y **).

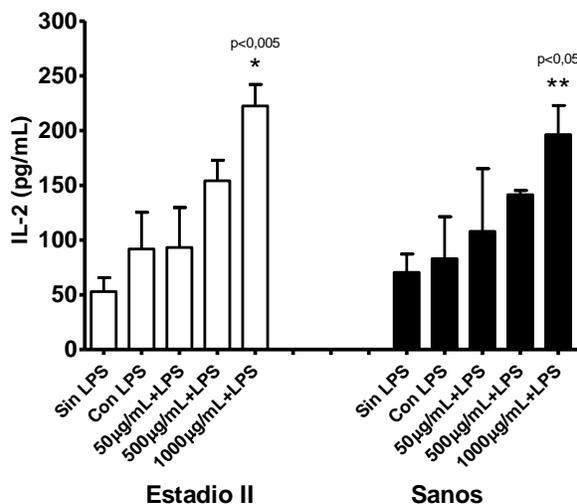


Figura 8. **Medición de los niveles de IL-2 (pg/mL).** Las PBMC ($0,5 \times 10^6$ cél/ml) de personas con adenocarcinoma mamario en estadio II (Estadio II) y personas sanas (Sanos) fueron cultivadas por 2h con o sin UG-POA y estimuladas con o sin LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se midió por CBA los niveles de citoquinas. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 6 Estadio II y 5 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$ (* y **).

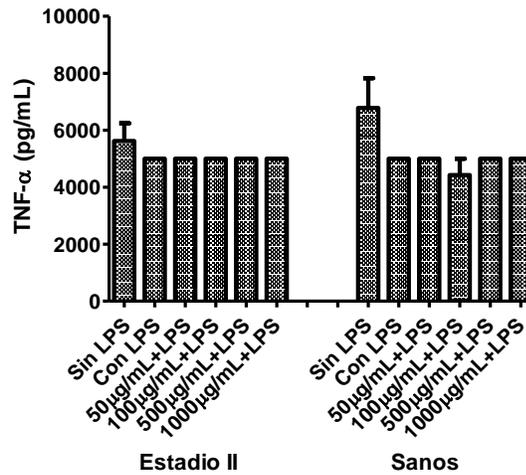


Figura 9. **Medición de los niveles de TNF- α (pg/mL)**. Las PBMC ($0,5 \times 10^6$ cél/ml) de personas con adenocarcinoma mamario en estadio II (Estadio II) y personas sanas (Sanos) fueron cultivadas por 2h con o sin UG-POA y estimuladas con o sin LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se midió por CBA los niveles de citoquinas. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 6 Estadio II y 5 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$ (* y **).

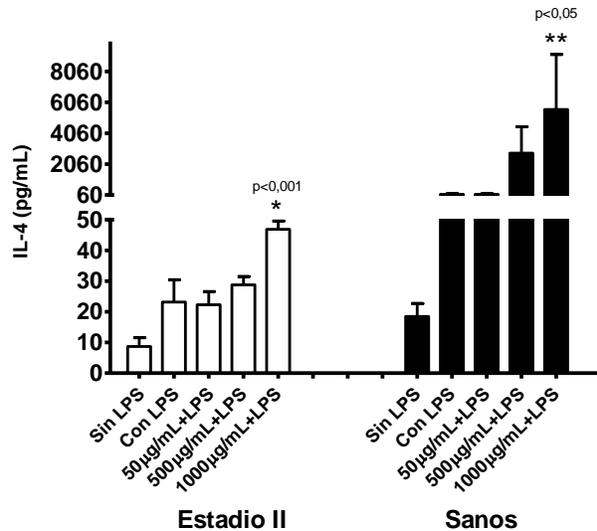


Figura 10. **Medición de los niveles de IL-4 (pg/mL)**. Las PBMC ($0,5 \times 10^6$ cél/ml) de personas con adenocarcinoma mamario en estadio II (Estadio II) y personas sanas (Sanos) fueron cultivadas por 2h con o sin UG-POA y estimuladas con o sin LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se midió por CBA los niveles de citoquinas. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 6 Estadio II y 5 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$ (* y **).

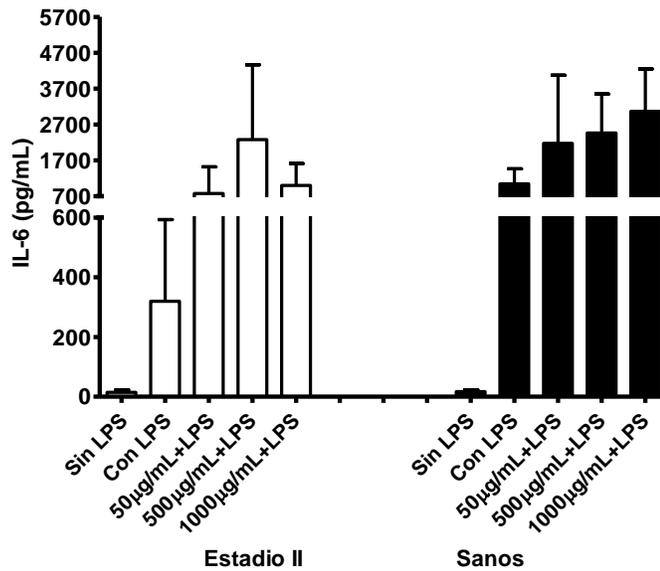


Figura 11. **Medición de los niveles de IL-6 (pg/mL).** Las PBMC ($0,5 \times 10^6$ cél/ml) de personas con adenocarcinoma mamario en estadio II (Estadio II) y personas sanas (Sanos) fueron cultivadas por 2h con o sin UG-POA y estimuladas con o sin LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se midió por CBA los niveles de citoquinas. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 6 Estadio II y 5 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$ (* y **).

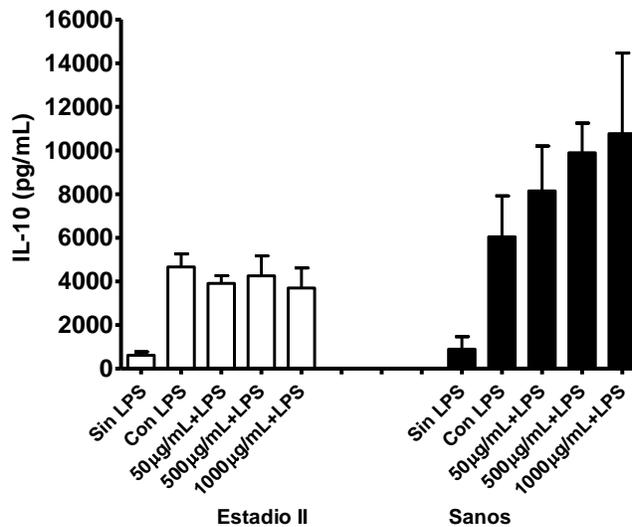


Figura 12. **Medición de los niveles de IL-10 (pg/mL).** Las PBMC ($0,5 \times 10^6$ cél/ml) de personas con adenocarcinoma mamario en estadio II (Estadio II) y personas sanas (Sanos) fueron cultivadas por 2h con o sin UG-POA y estimuladas con o sin LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se midió por ELISA los niveles de citoquinas. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 6 Estadio II y 5 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$ (* y **).

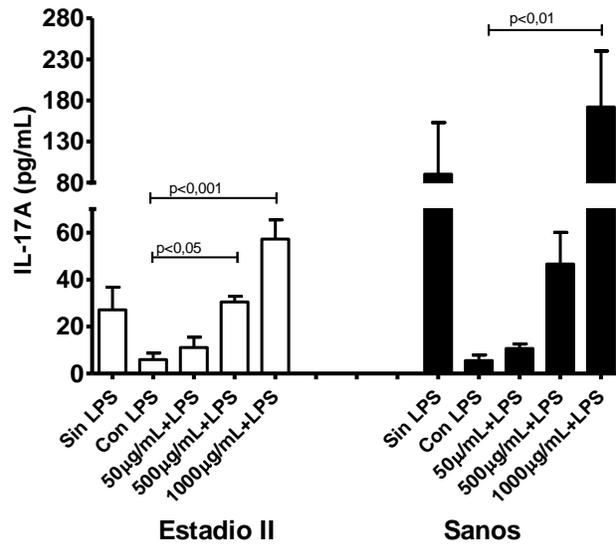


Figura 13. **Medición de los niveles de IL-17A (pg/mL)**. Las PBMC ($0,5 \times 10^6$ cél/ml) de personas con adenocarcinoma mamario en estadio II (Estadio II) y personas sanas (Sanos) fueron cultivadas por 2h con o sin UG-POA y estimuladas con o sin LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se midió por CBA los niveles de citoquinas. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 6 Estadio II y 5 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$ (* y **).

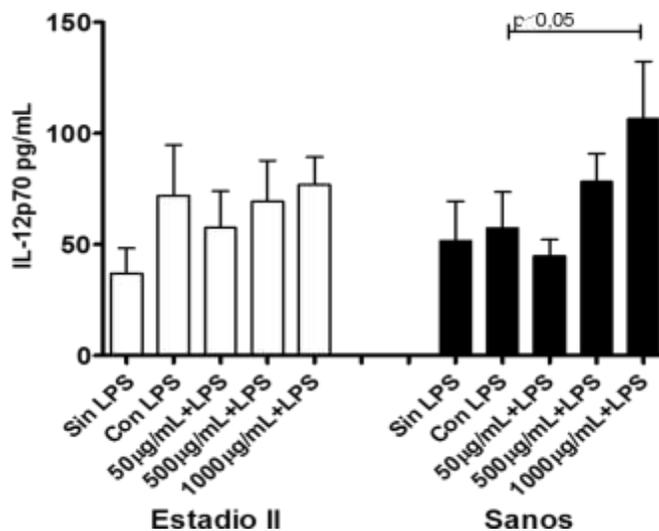


Figura 14. **Medición de los niveles de IL-12p70 (pg/mL)**. Las PBMC ($0,5 \times 10^6$ cél/ml) de personas con adenocarcinoma mamario en estadio II (Estadio II) y personas sanas (Sanos) fueron cultivadas por 2h con o sin UG-POA y estimuladas con o sin LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se midió por ELISA los niveles de citoquinas. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 6 Estadio II y 5 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$ (* y **).

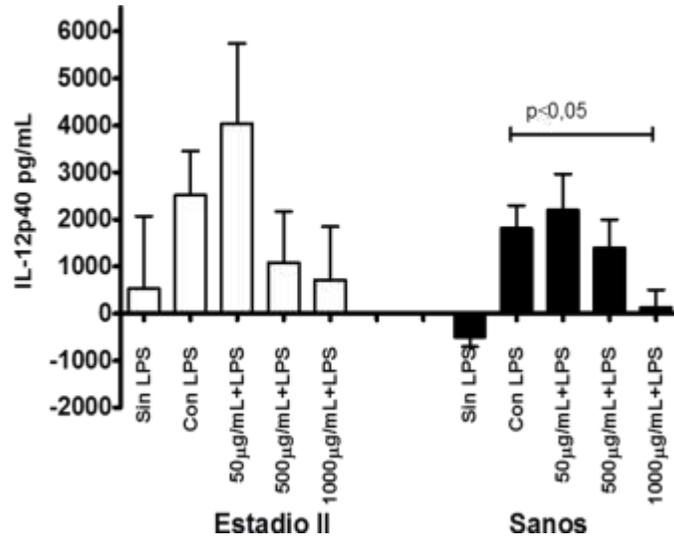


Figura 15. **Medición de los niveles de IL-12p40 (pg/mL)**. Las PBMC ($0,5 \times 10^6$ cél/ml) de personas con adenocarcinoma mamario en estadio II (Estadio II) y personas sanas (Sanos) fueron cultivadas por 2h con o sin UG-POA y estimuladas con o sin LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se midió por ELISA los niveles de citoquinas. Los resultados representan el promedio \pm EEM (Error Estándar de la Media) de 6 Estadio II y 5 Sanos. Se realizó un ANOVA one-way y el test post hoc de Fisher. Se consideró significancia estadística solo si $p < 0,05$ (* y **).

6. Discusión

El cáncer presenta un componente muy importante de evasión de los mecanismos inmunológicos de respuesta antitumoral de un ser humano. Por ejemplo, ciertas células tumorales pueden liberar factores capaces de inducir apoptosis a una de las células más importantes del sistema inmune, las células dendríticas evitando así que sean reconocidas y eliminadas por el sistema inmune del hospedero⁷⁸⁻⁸⁰. Otras células tumorales no liberan señales de peligro de modo que incluso si las DC inmaduras toman y procesan antígenos tumorales del microambiente o células tumorales apoptóticas, pueden producirse errores en su maduración, además que en un inicio los antígenos tumorales son poco inmunogénicos. Así entonces, es posible que aparezca una tolerancia inmunológica por parte de las DC⁸¹.

Las DC circulantes recogidas de los pacientes con cáncer parecen ser fenotípicamente y funcionalmente defectuosas⁸²⁻⁸⁴. Estudios previos han demostrado que factores liberados por el tumor como el factor transformante del crecimiento tipo beta (TGF- β), interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), ejercen un mecanismo por el cual impiden la diferenciación de las DC, debido a que inducen una escasa expresión de moléculas MHC y expresan niveles bajos de moléculas co-estimuladoras^{11, 23, 24}. Por lo que se reduce la capacidad de estimular a los LT^{16, 17, 20}.

En el presente estudio, nuestros resultados indican que la UG-POA a las concentraciones evaluadas no produce ningún efecto sobre las subpoblaciones de DC y sus moléculas de maduración (HLA-DR) y activación (CD86) en el grupo de pacientes con cáncer de mama de estadio II; sin embargo, en el grupo de mujeres sanas se encontró un efecto

significativo especialmente en la subpoblación de DCm donde se encontró que UG-POA disminuye esta subpoblación a 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ y más bien a 1000 $\mu\text{g/mL}$ aumenta la expresión de HLA-DR y CD86 en un efecto inmunomodulador aparentemente opuesto. Similares resultados fueron encontrados por Lozada-Requena et al.⁷⁵ quienes encontraron que a las mismas concentraciones la población de DCm disminuía significativamente mientras que las moléculas HLA-DR y CD86 no eran modificadas. En otro estudio similar pero con PBMC de pacientes con artritis reumatoide, Núñez et al.⁷⁴ encontraron que la subpoblación de DCm disminuía significativamente en tanto que las moléculas HLA-DR y CD86 se incrementaban también significativamente. En ambos estudios la actividad de las DCp no fue modificada significativamente. Estos resultados evidencian que la UG inmunomodula a la subpoblación de DCm alterando su comportamiento en mecanismos que servirían para evitar la presentación de antígenos al sistema inmune adaptativo. Esta característica tendría un valor agregado en enfermedades de tipo autoinmune pero no necesariamente en respuestas antitumorales donde se requiere que se muestren los antígenos del tumor al sistema inmune. En el caso de las DCp, como se ha evidenciado en este estudio y otros, esta subpoblación no se ve alterada por el extracto de UG-POA y, al menos en la respuesta anti-tumoral no cambiaría mucho el escenario debido a que es una subpoblación cuya función es eficiente frente a las infecciones virales a través de la producción de interferones alfa y beta que contribuyen a la eliminación de estos patógenos.

Adicionalmente, podemos sugerir que es posible que en el estadio II de cáncer de mama, las células de las pacientes evaluadas no respondan a UG-POA de la misma forma que lo

hacen las células de mujeres sanas precisamente por factores tumorales que impidan la acción de nuestro extracto.

Por otro lado, muchos de los mecanismos inmunológicos son gobernados por las citoquinas quienes son las comunicadoras celulares por excelencia. Por ejemplo, la IL-12 es capaz de direccionar una respuesta de tipo Th1 la cual activa la inmunidad celular por linfocitos T frente a células neoplásicas^{31, 32}. Esta misma citoquina mejora la función y promueve indirectamente la diferenciación y maduración de las DC a través de la inducción de la producción de citoquinas como IFN- γ , TNF- α , IL-6 y GM-CSF. Asimismo, IL-12 activa directamente a células de la inmunidad innata (NK-T y NK) y adaptativa (LT CD4 y CD8).^{32, 33} De estas citoquinas la más importante es IFN- γ ya que puede actuar directamente sobre el tumor, así como también sobre componentes endoteliales y estromales de su microambiente. IFN- γ mejora el reconocimiento del tumor por los LT, induce quimioquinas que reclutan efectores de ambas inmunidades, disminuye la angiogénesis incluyendo las moléculas de adhesión de células endoteliales limitándola⁸⁵.

Nuestros resultados demuestran que ni el heterodímero IL-12p70, ni la subunidad IL-12p40 son modificados por UG-POA en el grupo Estadio II, mientras que en el grupo de Sanas a 1000 μ g/mL de UG-POA la IL-12p70 aumenta y la IL-12p40 disminuye. Una explicación a este resultado es que parte de la IL-12p40 se dimeriza con la subunidad IL-12p35 para formar la IL-12p70. Como es sabido existe una familia de IL-12 conformada por los miembros IL-12, IL-23 y IL-27; además la subunidad p40 no solo forma la IL-12 sino también la IL-23, por lo que suponemos que la otra parte de IL-12p40 estaría

formando IL-23. Sin embargo, este hecho debe comprobarse midiendo esta otra citoquina. Según nuestros hallazgos, al menos en sujetos sanos, UG-POA favorecería la producción de IL-12 mientras que en el grupo Estadio II existiría alguna deficiencia en las PBMC que les impediría responder al extracto de UG.

Cuando evaluamos los resultados de las citoquinas Th1 en principio encontramos que en los dos grupos evaluados se da una sobreproducción de TNF- α a niveles que no es posible hacer comparaciones entre grupos, una alternativa hubiese sido diluir la muestra pero lamentablemente no se contó con suficiente cantidad. TNF- α es una citoquina sobre la que otros investigadores han encontrado que la *Uncaria tomentosa* es capaz de disminuir su producción⁷⁰⁻⁷³. Una alternativa es el análisis de IL-6 que a pesar de ser una citoquina Th2 tiene la misma naturaleza proinflamatoria de TNF- α por lo que se discutirá más adelante. Donde si encontramos un resultado destacable para UG-POA es sobre la producción de IFN- γ e IL-2 donde para ambos grupos evaluados se ven aumentos significativos de estas citoquinas. Líneas atrás ya se había mencionado la relevancia del IFN- γ en la respuesta antitumoral por lo que la UG-POA ayuda a mejorar el rol de esta citoquina. En el caso de IL-2, es la citoquina más importante producida por los LT inmediatamente después de su activación. IL-2 es un factor de crecimiento, sobrevivencia y diferenciación de los LT y es producida principalmente por los LT CD4, por lo que su presencia y aumento permitiría mejorar la inmunidad adaptativa celular antitumoral.

En relación a las citoquinas tipo Th2 los resultados muestran que en ambos grupos los niveles de IL-6 y IL-10 no son modificados por la UG-POA. Estos resultados no

tendrían mayor relevancia si Lemaire et al⁸⁷ no hubieran demostrado que en macrófagos alveolares de ratas dos extractos acuosos de *Uncaria tomentosa* disminuyeron la producción de IL-6; sin embargo, se trata de dos modelos distintos donde no necesariamente se puede encontrar reproducibilidad en los resultados.

Cuando evaluamos los resultados de la producción de IL-4 observamos que en ambos grupos a la concentración de 1000µg/mL se produce un aumento significativo de esta citoquina. La fuente de IL-4 son linfocitos T, mastocitos y algunas otras poblaciones celulares cuando es requerida para la diferenciación Th2, en nuestro caso al utilizar PBMC la fuente única son los LT. A pesar de que UG-POA logra incrementar sus niveles, la baja concentración en pacientes con cáncer de mama estadio II (menos de 50pg/mL) podría deberse a la relación mutuamente excluyente de las respuestas Th1/Th2 o a una deficiencia de las células de estas pacientes en producirla según la progresión del cáncer. No ocurre lo mismo con las pacientes sanas donde se logra un nivel de estimulación de más de 100 veces. Aunque siendo IL-4 poco relacionada con la inmunidad anti-tumoral se trata de una citoquina que si podría colaborar con ella, ya que activa la inmunidad humoral por linfocitos B productores de IgG1 e IgE y el aumento de la expresión MHCII; mejora la activación del LT y la función del eosinófilo⁸⁸. Los anticuerpos contra moléculas de superficie de células cancerígenas pueden inhibir señales oncogénicas y/o estimular la destrucción del tumor a través de la unión a receptores Fc de macrófagos, granulocitos y células NK. También pueden promover la presentación de antígenos tumorales por las células presentadoras de antígenos a través

de la formación de complejos inmunes⁸⁸. Por tales razones no debe descartarse la presencia de IL-4 en la respuesta antitumoral.

Una reciente subpoblación de LT descrita en humanos es la Th17, a la cual se le atribuía un rol en los procesos inflamatorios de enfermedades autoinmunes; sin embargo, hoy en día se sabe que es importante también en la respuesta antitumoral ya que la IL-17 que produce es capaz de inducir a tumores primarios a que produzcan quimioquinas, las que a su vez reclutan hacia el ambiente tumoral a DC, LT y células NK efectoras.²²

Nuestros resultados demuestran que en ambos grupos existe un aumento dosis-dependiente de los niveles de IL-17 que se hizo estadísticamente significativo a la concentración de 500 y 1000µg/mL. Asimismo, la producción de IL-17A es superior en el grupo de pacientes sanas que en pacientes con cáncer de mama estadio II, lo que nos indica que a pesar de que la progresión del cáncer en estas pacientes afecta la producción de IL-17A, esta logra ser mejorada por UG-POA.

Existen pocos estudios sobre las propiedades de *Uncaria tomentosa* en la respuesta antitumoral. Farias et al⁸⁸, demostraron la recuperación de neutrófilos después de una neutropenia inducida por quimioterapia en ratones tratados con ifosfamida. Dreifuss et al⁷⁷, demostraron en un modelo de carcinosarcoma en ratas como el mismo extracto que usamos en este estudio redujo el tamaño del tumor y al menos parcialmente tenía una capacidad de regulación redox y de la homeostasis del metabolismo.

En relación a las citoquinas comprometidas con la respuesta antitumoral existe un estudio que utiliza el ácido uncarínico C aislado de *Uncaria rhynchophylla* más IFN- γ , juntos modulan la función de las DC humanas de sujetos sanos de manera que favorecen

la producción de citoquinas Th1, especialmente IFN- γ por parte de los LT⁸⁹. Domingues et al⁷⁶ encontraron que un extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (con 1% alcaloides totales) inducía una diferenciación de tipo Th2 en el cultivo de esplenocitos de ratón tratados por 48h con 10 – 500 μ g/kg siendo principalmente IL-4 y IL-5 las citoquinas elevadas y IFN- γ , TNF- α y IL-2; estos resultados se asemejan a los nuestros, excepto con TNF- α ; sin embargo, se debe tener en cuenta que son modelos y condiciones distintas.

Los resultados obtenidos sobre células inmunocompetentes de pacientes con cáncer de mama indican que hay un importante efecto inmunomodulador sobre las citoquinas Th1 (IFN- γ e IL-2), Th2 (IL-4) y Th17 (IL-17A) que amerita la realización de más estudios que confirmen la capacidad citoprotectora de la Uña de Gato en la respuesta antitumoral.

7. Conclusiones

El extracto UG-POA:

- No altera los porcentajes de las subpoblaciones de DC, ni sus moléculas de maduración (HLA-DR) y activación (CD86) en el cultivo de PBMC de pacientes con cáncer de mama en estadio II; sin embargo, disminuye las subpoblaciones de DCm y aumenta las moléculas HLA-DR y CD86 en las PBMC de mujeres control sanas.
- No altera los niveles de IL-12p70 ni de IL-12p40 en el cultivo de PBMC de mujeres con cáncer de mama en estadio II; sin embargo, en las mujeres control sanas si existe un incremento de IL-12p70 y una disminución de IL-12p40; lo que favorece al menos en este grupo demostraría la direccionalidad hacia una respuesta de tipo Th1.
- Induce una marcada respuesta Th1, Th2 y Th17 tanto en el cultivo de PBMC de mujeres con cáncer de mama en estadio II como en mujeres control sanas, las que resultan importantes para el desarrollo de la respuesta antitumoral.
- En todos los casos, este extracto ha demostrado que en el rango de 500 – 1000µg/mL se producirían los mejores efectos antitumorales. A estas concentraciones no existe riesgo de citotoxicidad celular ya que la concentración inhibitoria (IC50) es mayor a 1mg/mL como lo han demostrado otros investigadores.

8. Referencias Bibliográficas

1. World Health Organization [sede web]. Geneva: WHO; Fact sheet N°297. February 2012. Disponible en dirección URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Consultado Marzo, 28 2012.
2. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN). Perfil Epidemiológico. Disponible en dirección URL: <http://www.inen.sld.pe/portal/estadisticas/datos-epidemiologicos.html>. Consultado Marzo, 28 2012.
3. Zitvogel, L., Tesniere, A. and Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Rev. Immunol.* 6, 715–727 (2006).
4. Geissmann F. The origin of dendritic cells. *Nature Immunology* 2007; 8: 558–60.
5. Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 1997; 9:10–16.
6. Hart, D.N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* 1997; 90:3245–3287.
7. Banchereau, J. and Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392:245–252.
8. Bell, D., Young, J.W. and Banchereau J. Dendritic cells. *Adv. Immunol.* 1999; 72:255–324.
9. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.

10. Decker, W.K., Xing, D., Sufang, L., Robinson, S.N., Yang, H., Yao, X., Segall, H., McMannis, J.D., Komanduri, K.V., Champlin, R.E. and Shpall, E.J. Double loading of dendritic cell MHC class I and MHC class II with an AML antigen repertoire enhances correlates of T-cell immunity in vitro via amplification of T-cell help. *Vaccine* 2006; 24: 3203–16.
11. Almand, B., Resser, J.R., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J.I., Kwon, E.D., Carbone, D.P. and Gabrilovich, D.I. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clinical Cancer Research* 2000; 6:1755–66.
12. Cerundolo, V., Hermans, I.F. and Salio, M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nature Immunology* 2004; 5: 7 – 10.
13. Danciger, J.S., Lutz, M., Hama, S., Cruz, D., Castrillo, A., Lazaro, J., Philips, R., Premack, B. and Berliner, J. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *Journal of Immunological Methods* 2004; 288: 123–34.
14. Morrison, R.S., Cruse, J.M., Wang, H. and Lewis, R.E. Dendritic cell differentiation and proliferation: enhancement by tumor necrosis factor – α . *Experimental and molecular pathology* 2003; 75: 226–37.
15. Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O. and Steinman, R.M. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 83-93.

16. Takahashi, K., Honeyman, M., and Harrison, L.C. Dendritic cells generated from human blood in granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-7. *Human Immunology* 1997; 55: 103–16.
17. Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Desutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D. and Banchereau. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CFS+TNF- α . *J Exp Med* 1996; 184: 695 – 706.
18. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., Banchereau, J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood*. 1997 Aug 15;90(4):1458-70.
19. Ardavin, C., Amigorena, S. and Reis e Sousa, C. Dendritic cells: Immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity* 2004; 20: 17 – 23.
20. Steinman, R.M., Hawiger, D. and Nussenzweig, M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 2003; 21: 685 – 710.
21. O'Neill, D.W. and Bhardwaj, N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* 2004; 104: 2235-46.
22. Zou, W. and Restifo, N.P. Th17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10:248-56

23. Gabrilovich, D.I. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 941–52.
24. Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. and Carbone, D.P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine* 1996; 2: 1096-1103.
25. Muraoka, R.S., Dumont, N., Ritter, C.A., Dugger, T.C., Brantley, D.M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L.R., Ryan, S., Gotwals, P.J., Kotliansky, V. and Arteaga, C.L. Blockage of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration and metastases. *The Journal of Clinical Investigation* 2002; 109: 1551-59.
26. Ellis, L.M. and Hicklin, D.J. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer* 2008; 8: 579-91.
27. Kiertscher, S.M., Luo, J., Dubinett, S.M. and Roth, M.D. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte derived dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 1269–76.
28. Lee, S.H., Kim, S.O., Lee, H.D. and Chung, B.C. Estrogens and polyamines in breast cancer: their profiles and values in disease staging. *Cancer Lett* 1998; 133: 47–56.
29. Hasko, G., Kubel, D.G., Marton, A., Nerneth, Z.H., Deitch, E.A., Szabo, C. Spermine differentially regulates the production of interleukin 12 p40 and interleukin 10 and suppress the release of the T helper 1 cytokine interferon γ . *Shock* 2000; 14: 144-49.

30. Della Bella, S., Gennaro, M., Vaccari, M., Ferraris, C., Nicola, S., Riva, A., Clerici, M., Greco, M. and Villa, M.L. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *British Journal of Cancer* 2003; 89: 1463–72.
31. Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E. and Maliszewski, E. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 1036-41.
32. Chhabra, A., Chakraborty, N.G. and Mukherji, B. Silencing of endogenous IL-10 in human dendritic cells leads to the generation of an improved CTL response against human melanoma associated antigenic epitope, MART-1 27-35. *Clin Immunol.* 2008 Mar;126 (3):251-9.
33. Lenahan, C. and Avigan, D. Dendritic cell defects in patients with cancer: mechanisms and significance. *Breast Cancer Research* 2006; 8: 1-3.
34. Pinzon-Charry, A., Maxwell, T., McGuckin, M.A., Schmidt, C., Furnival, C. and López, J.A. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Breast Cancer Research* 2006; 8: 1-10.
35. Trinchieri, G., Pflanz, S. and Kastelein, R.A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003;19:641-644.
36. Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M. and Murphy, K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24, 677–688.

37. Dong, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature Rev. Immunol.* 2006; 6, 329–333
38. Wynn, T. A. TH-17: a giant step from TH1 and TH2. *Nature Immunol.* 2005; 6, 1069–1070.
39. Harrington, L. E. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunol.* 2005; 6, 1123–1132.
40. Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H. and Lavelle, E.C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 2006; 203, 1685–1691.
41. Komiyama, Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2006; 177, 566–573.
42. Tato, C.M. and O’Shea, J. J. Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* 2006; 441, 166–168.
43. Ouyang, W., Kolls, J.K. and Zheng, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28, 454–467.
44. Horlock, C. The effects of trastuzumab on the CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD4⁺IL17A⁺ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* 2009; 100, 1061–1067.
45. Kryczek, I. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumour environments. *Blood* 2009; 114, 1141–1149.

46. Precopio, M.L. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8+T cell responses. *J. Exp. Med.* 2007; 204, 1405–1416.
47. Almeida, J.R. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* 2007; 204, 2473–2485.
48. Muranski, P. and Restifo, N.P. Does IL-17 promote tumour growth? *Blood* 2009; 114, 231–232.
49. Munn, D.H. Th17 cells in ovarian cancer. *Blood* 2009; 114, 1134–1135.
50. Bronte, V. Th17 and cancer: friends or foes? *Blood* 2008; 112, 214.
51. Curiel, T.J. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Med.* 2004; 10, 942–949.
52. Martin-Orozco, N. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumour immunity. *Immunity* 2009; 31, 787–798.
53. Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L. and Zou, W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumour growth and metastasis. *Blood* 2009; 114, 357–359.
54. Sandoval, M., Charbonnet, R., Okuhama, N., Roberts, J., Krenova, Z., Trentacosti, M., Miller, M.J.S. Cat's Claw inhibits TNF- α production and scavenges free radicals: Role in cytoprotection. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 29 (1): 71-78.
55. Chang, D.M., Kuo, S.Y., Lai, H., Chang, M.L. Effects of anti-rheumatic herbal medicines on cellular adhesion molecules. *Ann Rheum Dis* 1999; 58:366-371.
56. Taylor, L. Technical data report for Cat's Claw "Uña de Gato" (*Uncaria tomentosa*). Preprinted from *herbal secrets of the rainforest*, 2nd edition. 2002. Published and Copyrighted by SAGE Press, Inc.

57. Mestanza, M. Evaluación de la actividad inmunoestimulante de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Uña de gato en ratones albinos. Biodiversidad y Salud. Instituto Peruano de Seguridad Social. Instituto de Medicina Tradicional 1998; 1:16 – 19.
58. Reinhard, K-H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: Cat's claw, Uña de Gato, or Savéntaro. The Journal of Alternative and Complementary Medicine 1999; 5: 143–51.
59. Keplinger, K., Wagner, H. and Kreutzkamp, B. Oxindole alkaloids having properties stimulating the immunologic systems. 1989; Patent Number: 4,844,901. United States Patent.
60. Falkiewicz, B. and Tukasiak, J. Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmel.] – a review of published scientific literature. Case Rep Clin Pract Rev. 2001; 2:305-16.
61. Laus, G., Brossner, D. and Keplinger, K. Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. Phytochemistry 1997; 45: 855 – 860.
62. Wurm, M., Kacani, L., Laus, G., Keplinger, K. and Dierich, M.P. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endotelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. Planta Medica 1998; 64: 701–04.
63. Berry, J.P., Laux, M. and Rodriguez, E. Inhibition of protein tyrosine kinase activity and induction of apoptosis in epithelial cells by oxindole alkaloids of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. J. Med. Sci. 2002; 2: 110–14.
64. Rizzi, R., Re, F., Bianchi, A., De Fed, V., De Simone, F., Bianchi, L. and Stivala, A.L. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. Journal of Ethnopharmacology 1993; 38: 63–77.

65. Sheng, Y., Pero, R.W., Amiri, A. and Bryngelsson, C. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Research* 1998; 18: 3363-68.
66. Sheng, Y., Bryngelsson, C. and Pero, R.W. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED 100TM, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 69: 115–26.
67. Mammone, T., Åkesson, C., Gan, D., Giampapa, V. and Pero, R.W. A water soluble extract from *Uncaria tomentosa* (cat's claw) is a potent enhancer of DNA repair in primary organ cultures of human skin. *Phytotherapy Research* 2006; 20:178-183.
68. Aguilar, J.L., Rojas, P., Marcelo, A., Plaza, A., Bauer, R., Reininger, E., Klaas, C.A. and Merfort, I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol* 2002; 81:271-76.
69. Rojas, P.A. Producción del factor de necrosis tumoral alfa en un modelo in-vivo y su inhibición por un extracto de *Uncaria tomentosa* (Uña de gato). [Tesis de Licenciatura]. Biblioteca Central, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Lima, Perú. 2002
70. Lozada-Requena, I. Efecto inmunomodulador de capsaicina y *Uncaria tomentosa* (uña de gato) sobre la producción del factor de necrosis tumoral de tipo alfa e interleuquina 10 y sobre la inducción de apoptosis en células mononucleares de sangre periférica humanas [Tesis de Magister]. Biblioteca Central, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Lima-Perú 2006
71. Sandoval, M., Okuhama, N.N., Zhang, X-J, Condezo, L.A., Lao, J., Angeles, F.M., Musah, R.A., Bobrowski, P. and Miller, M.J.S. Anti-inflammatory and antioxidant

activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 2002; 9: 325-37.

72. Fazio, A.L., Ballen, D., Cesari, I.M., Abad, M.J., Arsenak, M. and Taylor, P. An ethanolic extract of *Uncaria tomentosa* reduces inflammation and B16-BL6 melanoma growth in C57BL/6 mice. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica* 2008; 7(4):217-224.

73. Núñez, C., Lozada-Requena, I., Akamine, I., Carbajal, L. and Aguilar, J.L. Efecto de *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato) sobre la población y activación de células dendríticas de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoidea. *Acta Méd Per* 2008; 25: 135 - 39.

74. Lozada-Requena, I., Núñez, C., Álvarez, Y. and Aguilar, J.L. Efecto de un extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) sobre la población de células dendríticas y sus moléculas HLA-DR y CD86 ante el estímulo con lipopolisacáridos. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2009; 26(2):168-174.

75. Pinzon-Charry, A., Ho, C.S.K., Maxwell, T., McGuckin, M.A., Schmidt, C., Furnival, C., Pyke, C.M. and López, J.A. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *British Journal of Cancer* 2007; 97: 1251-59.

76. Domingues, A., Sartori, A., Valente, L.M., Golim, M.A., Siani, A.C., Viero, R.M. *Uncaria tomentosa* aqueous-ethanol extract triggers an immunomodulation toward a Th2 cytokine profile. *Phytother Res.* 2011; 25(8):1229-35.

77. Dreifuss, A.A., Bastos-Pereira, A.L., Avila, T.V., Soley Bda, S., Rivero, A.J., Aguilar, J.L., Acco, A. 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.
78. Esche, C., Lokshin, A., Shurin, G.V., Gastman, B.R., Rabinowich, H., Watkins, S.C., Lotze, M.T., and Shurin, M.R. Tumor's other immune targets: dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66:336–344.
79. Esche, C., Shurin, G.V., Kirkwood, J.M., Wang, G.Q., Rabinowich, H., Pirtskhalaishvili, G., and Shurin, M.R. Tumor necrosis factor- α promoted expression of Bcl-2 and inhibition of mitochondrial cytochrome *c* release mediate resistance of mature dendritic cells to melanoma-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 974s–979s.
80. Timmerman, J.M. and Levy, R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999;50: 507–529.
81. Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001;2: 293–299.
82. Gabrilovich, D.I., Corak, J., Ciernik, I.F., Kavanaugh, D. and Carbone, D.P. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 1997; 3:483.
83. Radmayr, C., Bock, G., Hobisch, A., Klocker, H., Bartsch, G. and Thurnher, M. Dendritic antigen-presenting cells from the peripheral blood of renal cell carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 1995; 63:627.

84. Troy, A.J., Summers, K.L., Davidson, P.J., Atkinson, C.H. and Hart, D.N. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 1998. 4:585.
85. Del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M.T., Wesa, A., Parmiani, G. and Anichini, A. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. *Clin Cancer Res* 2007; 13(16): 4677-85.
86. Lemaire, I., Assinewe, V., Cano, P., Awang, D.V.C. and Arnason, J.T. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 64:109–115
87. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4:11-22.
88. Farias, I., Araújo, M.C., Zimmermann, E.S., Dalmorab, S.L., Benedetti, A.L., Alvarez-Silva, M., Cavazzin Asbahr, A.C., Bertole, G., Farias, J. and Chitolina Schetingera, M.R. *Uncaria tomentosa* stimulates the proliferation of myeloid progenitor cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 137:856-63.
89. Bae, W.K., Umeyama, A., Chung, I-J., Lee, J-J. and Takei, M. Uncarinic acid C plus IFN- γ generates monocyte-derived dendritic cells and induces a potent Th1 polarization with capacity to migrate, *Cellular Immunology* 2010; 266:104–110.

9. Anexos

9.1. Formato de Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Código Identificación:..... Versión: 2 Fecha:...../...../..... Página 1 de 2

Inmunomodulación de subpoblaciones de células dendríticas, moléculas accesorias (HLA-DR y CD86) y citoquinas Th1/Th2/Th17 y IL-12 por *Uncaria tomentosa* (Uña de gato) a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama

Ysmodes T, Nuñez C, Lozada-Requena I, Dávila S, Ocampo C, Aguilar J L

1. Propósito

Los investigadores arriba indicados formamos parte del equipo del laboratorio de inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, estamos haciendo un estudio con Uña de Gato y Cáncer de Mama con el objetivo de determinar si este producto natural tiene algún efecto sobre unas células de su sistema inmunológico llamadas células dendríticas y sus moléculas, las que participan en la respuesta contra los tumores.

Su participación en este estudio es voluntaria y por única vez por medio de una toma de muestra de sangre con la que se aplicarán pruebas de laboratorio como Citometría de Flujo y ELISA. Usted decide su participación, si escoge no hacerlo, no habrá ninguna represalia hacia su persona de ningún tipo.

Puede que este consentimiento contenga términos que usted no comprenda. Por favor, pídanos que nos detengamos mientras repasamos el estudio y nos tomaremos el tiempo necesario para explicarlos. Si más tarde tiene preguntas, puede planteárnoslas.

2. Riesgos

La toma de muestra de sangre es un procedimiento de rutina que no tiene un riesgo físico ni psicológico para Ud. Podría existir una leve incomodidad al momento de introducir y retirar la aguja pero es un dolor soportable y calmará rápidamente.

3. Beneficios

No habrá ningún beneficio directo para usted, pero con su muestra podría ayudarnos a determinar las propiedades anti-tumorales de la Uña de Gato.

4. Procedimientos

Para su participación se le realizará una toma de muestra de sangre en cuatro tubos de 9mL con anticoagulante y un tubo de 7mL sin anticoagulante. Sus muestras serán remitidas al Laboratorio de Inmunología # 108 de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima, para las respectivas pruebas de laboratorio.

El estudio no contempla ningún tratamiento alternativo, solo se realizará una toma de muestra de sangre del participante.

5. Confidencialidad

La información de los resultados obtenidos del análisis de las muestras serán codificados. Adicionalmente, la información se encontrará bajo seguridad en el Laboratorio de Inmunología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con único acceso al equipo investigador del laboratorio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Código Identificación:..... Versión: 2 Fecha:...../...../..... Página 2 de 2

6. Declaración del participante

Su participación es totalmente voluntaria, podrá elegir si quiere donar su muestra de sangre o elegir si quiere que no se use la muestra o resultados en el momento que desee, aún cuando sus familiares/apoderados lo hayan aceptado.

7. ¿Con quién debo contactarme cuando tenga preguntas sobre el estudio y mi participación?

Dr. César Núñez Ponce Tel: [REDACTED] e-mail [REDACTED]
Sección Inmunología – Universidad Peruana Cayetano Heredia
Av. Honorio Delgado 430 SMP – Lima

MSc. Iván Lozada Requena Tel: [REDACTED] e-mail [REDACTED]
Sección Inmunología – Universidad Peruana Cayetano Heredia
Av. Honorio Delgado 430 SMP – Lima

BSc. Tíndara Ysmodes Nastasi Tel: [REDACTED] e-mail [REDACTED]
Sección Inmunología – Universidad Peruana Cayetano Heredia
Av. Honorio Delgado 430 SMP – Lima

Si tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, puede contactar con el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia al teléfono 01-319-000 anexo 2271 / 2542.

He leído este documento y realice las preguntas, donde fueron aclaradas todas mis dudas con total satisfacción, me han leído y explicado el documento. Es por ello que consiento voluntariamente se me tome la muestra de sangre requerida para participar en el estudio y entiendo que tengo el derecho de decidir que no se utilice mi muestra cuando así yo lo decida sin que ello afecte mi integridad como persona.

Si Ud. está de acuerdo en participar en este estudio, por favor firme el presente consentimiento. Le daremos una copia de este documento.

Nombres y apellidos del participante:

Nombre del apoderado (si lo hubiera):

Firma o marca del participante o apoderado Lima, ____ de ____ de 20__

Firma de la persona que obtiene el consentimiento Lima, ____ de ____ de 20__

9.2. Citometría de flujo. Procedimiento de análisis de datos obtenidos con el software Summit 4.3

La estrategia de selección usada para definir las subpoblaciones de DC y sus moléculas de superficie por citometría de flujo fue la que detalla a continuación. Se realizó una selección (R1) para incluir linfocitos y monocitos en una gráfica dot plot de forward scatter (fSC) vs side scatter (SSC). A partir de aquí se establecieron estrategias de selección secuenciales para definir las subpoblaciones de DC sanguíneas: DC mieloides CD11c+HLA-DR+Lin1- y DC plasmacitoides CD11c-HLADR+Lin1-, como se muestra en la figura 17.

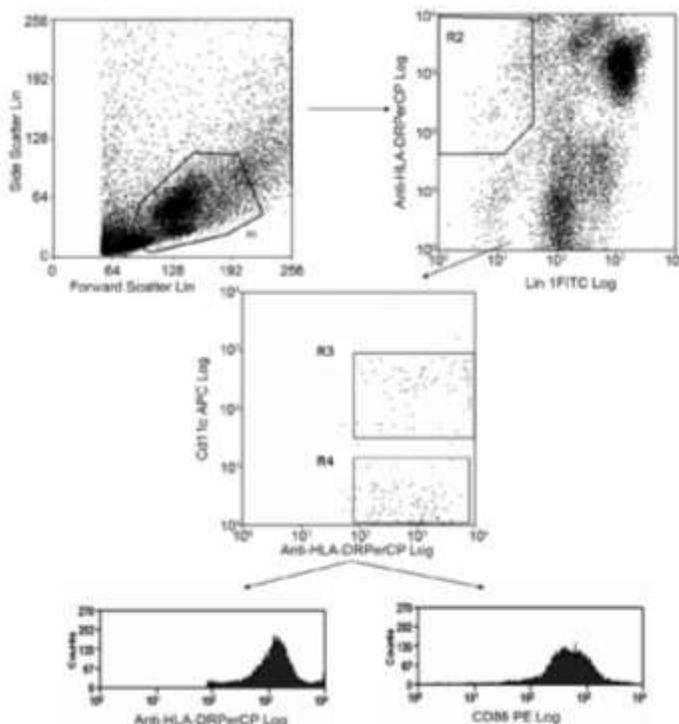


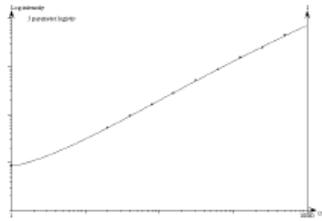
Figura 17. Estrategia de selección usada para definir las subpoblaciones de DC y sus moléculas de superficie

Las regiones R1 y R2 (cajas sólidas) fueron creadas para definir los porcentajes DC mieloides o CD11c+HLA-DR+Lin1- (R3) o DC plasmacitoides CD11c-HLA-DR+Lin1- (R4). A partir de R3 y R4 se obtuvieron histogramas que expresan la Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de las moléculas HLADR y CD86 para ambas subpoblaciones de DC.

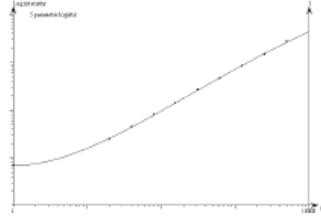
9.3. Preparación de reactivos para la medición de citoquinas Th1/Th2/Th17 por Cytometric Bead Array (CBA)

Todos los reactivos fueron mantenidos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.

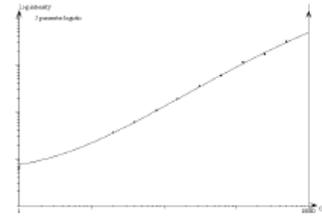
- Representaciones graficas de las curvas Standard para cada una de las citoquinas Th1/Th2/Th17



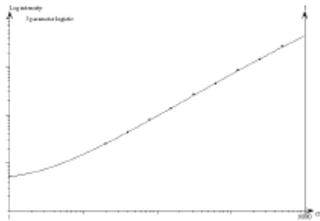
IL-2



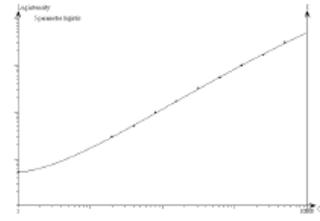
IL-4



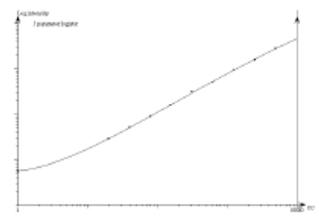
IL-6



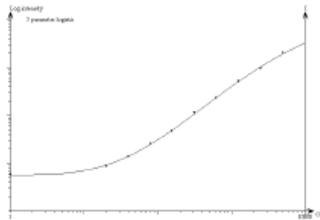
IL-10



TNF



IFN-γ



IL-17A

- Estándares

Se realizaron diluciones seriadas añadiendo 300μL de cada standard al tubo siguiente (Figura 18). Vortex para mezclar entre cada transferencia. El tubo con el standard no diluido sirvió como la concentración del standard más alto. El diluyente del standard sirvió como la concentración cero del standard.

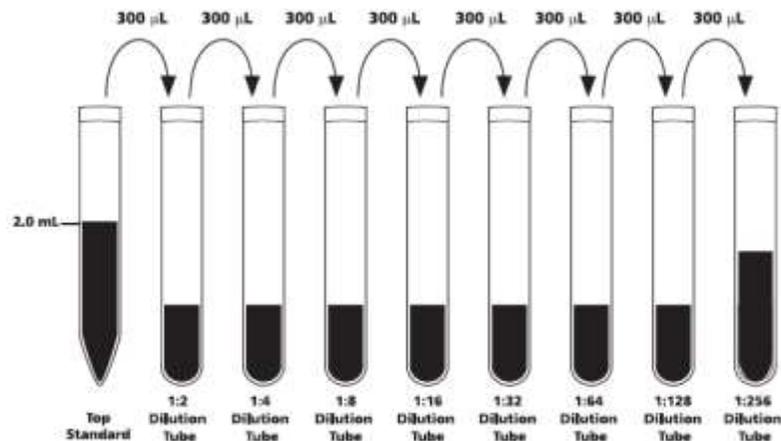


Figura 18. Diluciones seriadas del standard

9.4. Preparación de reactivos para la medición de IL-12 e IL6 por enzimmunoensayo (ELISA)

Todos los reactivos fueron mantenidos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.

- Estándares
1. Se reconstituyó un vial liofilizado de standard con el volumen requerido (indicado en la etiqueta del vial) de diluyente del estándar para preparar un 500 pg/mL de solución stock. Se dejó el standard equilibrar durante al menos 15 minutos antes de hacer las diluciones. Vortex para mezclar.
 2. Se adicionó 300µL del diluyente del estándar a 6tubos de vidrio con los siguientes rótulos: 250pg/mL, 125pg/mL, 62,5pg/mL, 31,3pg/mL, 15,6pg/mL y 7,8pg/mL.
 3. Se realizaron diluciones seriadas añadiendo 300µL de cada standard al tubo siguiente (Figura 19). Vortex para mezclar entra cada transferencia. El tubo

con el standard no diluido sirvió como la concentración del standard más alto (500pg/mL). El diluyente del standard sirvió como la concentración cero del standard (0pg/ml).

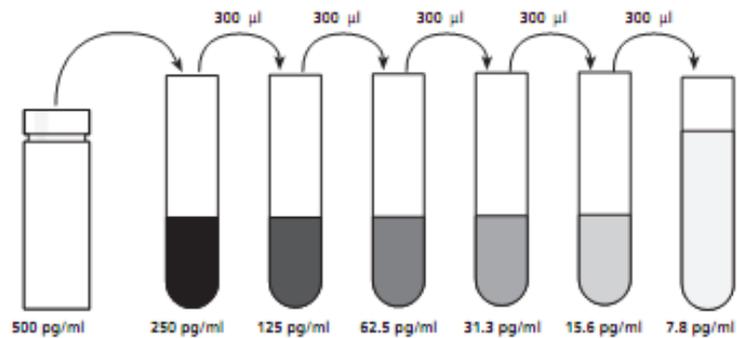


Figura 19. Diluciones seriadas del standard

- Solución de lavado

Se preparó 2 litros de solución de lavado, para lo cual se adicionó 100mL del concentrado de lavado a 1900mL de agua.

- Anticuerpo de detección

Quince minutos antes de su uso, se colocó 12mL del anticuerpo de detección en un tubo de vidrio limpio. Se adicionó 48µL del concentrado de enzimas (250X) y se mezcló bien.

- Sustrato de detección

Quince minutos antes de su uso, se mezcló volúmenes iguales del reactivo Sustrato A y del reactivo de Sustrato B en un tubo de vidrio limpio. Se preparó 12mL (6mL de Sustrato A + 6mL de Sustrato B) de Sustrato en solución. Se evite la exposición prolongada a la luz, el aire o temperaturas extremas.