

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EFFECTO INMUNOESTIMULANTE DE LA *Uncaria tomentosa* EN RATAS
INMUNODEPRIMIDAS CON EL USO DE CICLOFOSFAMIDA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

DIANA PAOLA NÚÑEZ REYNA

TRUJILLO, PERÚ

2021

La presente tesis ha sido revisada y aprobada por el siguiente Jurado:



MV. Mg. Luis Abraham Ortiz Tenorio
PRESIDENTE



MV. Mg. Raquel Ramírez Reyes
SECRETARIO



Mblgo. Mg. Roxana Mendoza Mendocilla
VOCAL



MVZ. Mg. Angélica María Huamán Dávila
ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos que siempre me ha estado apoyando y aunque desconozcan totalmente del tema ellos buscan la manera de ayudarme con estos proyectos, dándome aliento y ánimos en buenos y malos momentos de mi carrera profesional y de mi vida.

A mis mascotas que siempre fueron mi fuente de inspiración y mi pasión por la cual estudié medicina veterinaria.

AGRADECIMIENTO

Quisiera agradecer infinitamente a mi asesora la Dra. Angelica Huamán por su paciencia y guía en todo este camino de mi proyecto, por su espectacular asesoría y sobre todo el apoyo que me brindó en momentos donde había tan pocas facilidades.

A mi familia que me apoyó con la realización del proyecto, y me asistió en el manejo y cuidado de los ejemplares.

A los doctores que me han apoyado a lo largo de la parte experimental como lo hizo el Dr. Alejandro Pereda, el Dr. Alain Plasencia y el Dr. Esteban, siempre dándome buenos consejos y alternativas a las complicaciones que se presentaban, sin ellos no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

A mis amigos y colegas, que me estuvieron en toda esta etapa del proyecto y que influyeron en él, tanto directamente como indirectamente, mi más extensa gratitud para ellos.

ÍNDICE

	Pág.
<u>CARÁTULA</u>	i
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA.....	3
2.1. Rata de laboratorio (<i>Rattus norvegicus</i>).....	3
2.1.1. Datos biológicos.....	3
2.1.2. Alimentación.....	3
2.1.3. Ambiente.....	4
2.1.4. Recolección de muestras.....	5
2.1.5. Valores hematológicos.....	6
2.2. Respuesta inmune.....	7
2.2.1. Órganos linfoides primarios y secundarios.....	7
2.2.2. Inmunidad innata y células.....	8
2.2.3. Inmunidad adquirida: Humoral y celular.....	9
2.3. Inmunosupresión del paciente.....	11
2.3.1. Mecanismos.....	11
2.3.2. Ciclofosfamida.....	11
2.4. Inmunoestimulantes.....	12
2.5. Uña de gato (<i>Uncaria tomentosa</i>).....	12
2.5.1. Composición química.....	13
2.5.2. Alcaloides presentes en la planta.....	15

2.5.3.	Aplicaciones farmacológicas	17
2.5.4.	Efecto inmunoestimulante	18
2.5.5.	Toxicidad y dosificación	19
2.5.6.	Contraindicaciones.....	19
2.5.7.	Otros estudios.....	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1.	Lugar de ejecución.....	21
3.2.	Animales de estudio.....	21
3.3.	Manejo y alimentación	21
3.4.	Instalaciones	22
3.5.	Variable independiente	22
3.6.	Tratamientos	22
3.7.	Variables dependientes.....	23
3.8.	Procedimiento y metodología.....	23
3.8.1.	Administración del extracto de uña de gato.....	23
3.8.2.	Proceso de inmunosupresión	23
3.8.3.	Toma de muestras	24
3.8.4.	Exámenes de laboratorio	24
3.9.	Condiciones éticas	25
3.10.	Análisis estadístico.....	25
IV.	RESULTADOS.....	26
4.1.	Valores hematológicos.....	26
4.2.	Celularidad de órganos linfoides	29
V.	DISCUSIÓN.....	34
5.1.	Valores hematológicos.....	34
5.2.	Celularidad de órganos linfoides	38
VI.	CONCLUSIONES	41
VII.	RECOMENDACIONES	42
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	43
IX.	ANEXOS.....	47

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Valores biológicos de rata de laboratorio.....	3
Cuadro 2. Estimación promedio de ingesta de comida (g/día).....	4
Cuadro 3. Composición nutricional del alimento balanceado Biovita.....	4
Cuadro 4. Volumen máximo de extracción de sangre de <i>R. norvegicus</i>	6
Cuadro 5. Valores hematológicos de las ratas de laboratorio <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> hembras y machos.....	6
Cuadro 6. Componentes de la inmunidad innata y sus funciones	9
Cuadro 7. Concentración de alcaloides en corteza de <i>Uncaria tomentosa</i> cultivada en distintas altitudes	14
Cuadro 8. Propiedades farmacológicas de alcaloides encontrados en la planta <i>Uncaria tomentosa</i>	16
Cuadro 9. Valores iniciales de parámetros de la serie roja, según tratamientos.....	26
Cuadro 10. Valores finales de parámetros de la serie roja, según tratamientos.....	27
Cuadro 11. Valores iniciales de parámetros de la serie blanca y plaquetaria, según tratamientos.....	28
Cuadro 12. Valores finales de parámetros de la serie blanca y plaquetaria, según tratamientos	29
Cuadro 13. Promedio de conteo celular en Bazo, según tratamientos	30
Cuadro 14. Valores iniciales de parámetros de la serie roja, según tratamientos.....	31
Cuadro 15. Valores iniciales de parámetros de la serie roja, según tratamientos.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Promedio de conteo celular final en Bazo, según tratamientos.....	30
Figura 2. Promedio de conteo celular final en Médula Ósea, según tratamientos.....	31
Figura 3. Promedio de conteo celular final en Timo, según tratamientos.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Preparación de las ratas para la toma de muestra con anestesia inhalatoria	46
Anexo 2. Extracción de sangre por vía intracardiaca.....	46
Anexo 3. Muestra de Timo de rata sana.....	47
Anexo 4. Muestra de Timo de rata inmunodeprimida.....	47
Anexo 5. Muestra de Timo de rata inmunoestimulada con Uña de Gato	48
Anexo 6. Muestra de Bazo de rata sana.....	48
Anexo 7. Muestra de Bazo de rata inmunodeprimida.....	49
Anexo 8. Muestra de Bazo de rata inmunoestimulada con Uña de Gato.....	49
Anexo 9. Muestra de Médula Ósea de rata sana.....	50
Anexo 10. Muestra de Médula Ósea de rata inmunodeprimida.....	50
Anexo 11. Muestra de Médula Ósea de rata inmunoestimulada con Uña de Gato.....	51

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto inmunoestimulante de la tintura de Uña de gato (*Uncaria tomentosa*) en ratas inmunosuprimidas, se utilizaron 29 ratas albinas machos, destetadas a los 30 días de nacidos, las cuales fueron distribuidas a través de un diseño completamente al azar en cuatro tratamientos; grupo control administrando NaCl vía intraperitoneal en reemplazo a la ciclofosfamida y vía oral sustituyendo la Uña de gato (T1), grupo inmunosuprimido con ciclofosfamida a 2 dosis de 50 mg/kg y NaCl vía oral en reemplazo de la Uña de gato (T2), grupo inmunosuprimido con ciclofosfamida a 2 dosis de 50 mg/kg y Uña de gato vía oral 100mg/kg (T3), grupo inmunosuprimido con ciclofosfamida a 2 dosis de 50mg/kg y Uña de gato vía oral 200mg/kg (T4). A los grupos T3 y T4 se les administró la tintura de Uña de gato por 15 días consecutivos, los grupos fueron evaluados al inicio (día 0) y final del experimento mediante hemogramas y celularidad de órganos linfoides como médula ósea, timo y bazo (día 18). Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza y prueba de Tukey. En la serie roja no se apreciaron diferencias significativas entre grupos de tratamientos, por otro lado se observó la elevación de los valores leucocitarios como neutrófilos y linfocitos en los grupos T3 (100 mg/kg) y T4 (200 mg/kg), éste último sin diferencias significativas con el grupo control T1(NaCl), aproximándose a los valores inicialmente obtenidos; de igual forma en el conteo de células de los órganos linfoides, a pesar de no presentarse diferencias significativas entre tratamientos, la dosis de 200 mg/kg (T4) de *Uncaria tomentosa* mostró los mejores resultados en médula ósea y bazo, y la de 100 mg/kg en el timo, demostrando su efecto inmunoestimulante en relación a la dosis administrada vía oral (dosis-dependiente).

ABSTRACT

In order to evaluate the immunostimulant effect of Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) tincture in immunosuppressed rats, 29 male albino rats, weaned at 30 days of birth, were used, which were distributed through a completely randomized design in four treatments; control group administering NaCl via intraperitoneal to replace cyclophosphamide and orally to replace cat's claw (T1), immunosuppressed group with cyclophosphamide at 2 doses of 50 mg /kg and NaCl administered orally to replace cat's claw (T2), immunosuppressed group with cyclophosphamide at 2 doses of 50mg/kg and Cat's Claw oral route 100 mg/kg (T3), immunosuppressed group with cyclophosphamide at 2 doses of 50 mg/kg and Cat's Claw oral route 200 mg/kg (T4). Cat's claw tincture was administered to groups T3 and T4 for 15 consecutive days, and the groups were evaluated at the beginning (day 0) and end of the experiment by means of hemograms and cellularity of lymphoid organs such as bone marrow, thymus and spleen (day 18). Results were analyzed by analysis of variance and Tukey's test. In the red series, there were not significant differences between treatment groups, on the other hand, it was observed the elevation of leukocyte values such as neutrophils and lymphocytes in the groups T3 (100 mg/kg) and T4 (200 mg/kg), this last one without significant differences with the control group T1(NaCl), approaching the initially obtained values; Similarly, in the cell count of lymphoid organs, despite no significant differences between treatments, the 200 mg/kg (T4) dose of *Uncaria tomentosa* showed the best results in bone marrow and spleen, and the 100mg/kg in thymus, showing its immunostimulant effect in relation to the dose administered orally (dose-dependent).

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la tendencia de tener animales de compañía ha ido creciendo; a consecuencia de ello, la labor del médico veterinario se vuelve más necesaria, tanto en la prevención de enfermedades como en los tratamientos adecuados, ofreciendo una alternativa y una mejor calidad de vida al paciente, buscando la solución más adecuada y más accesible para poder llevar a cabo nuestra labor.

En la ciudad de Trujillo, podemos ver la creciente incidencia de enfermedades virales en animales de compañía que llegan a las veterinarias, esto sucede por la falta de atención a las mascotas por parte de la mayoría de dueños o por la falta de información acerca de las vacunas que se puedan aplicar, respetando el calendario de vacunas; otra razón sería un mayor número de animales callejeros portadores y transmisores de distintas patologías, que al tener contacto con las mascotas, podrían llegar a infectarlos, de manera que resulta dificultoso evitar el contagio y dispersión de estos virus.

Por otro lado, el ataque de los virus, el uso incorrecto de fármacos, cuadros de estrés, infecciones microbianas o parasitarias, toxinas incluso la malnutrición pueden provocar un cuadro de inmunosupresión, que puede conllevar a problemas aún más críticos, ya que el animal se encuentra inmunocomprometido, y por ende propenso a enfermedades secundarias tanto como infecciones bacterianas o parasitarias; volviéndose incapaz de producir una respuesta adecuada ante patógenos (Tizard, 2009).

En este tipo de casos se emplea lo comúnmente llamado tratamiento de sostén, esto suele aplicarse en enfermedades víricas que, al no tener cura o algún tratamiento específico, solo se tratan los signos clínicos o las complicaciones

que puedan presentar a futuro, este tipo de procedimientos médicos se realizan durante toda la vida del animal, junto con el uso de una alimentación adecuada para evitar comprometer la funcionalidad del sistema inmune, de esta manera el paciente tendrá mejor calidad de vida. Por otro lado, los animales enfermos muchas veces no logran realizar su tratamiento de sostén, debido a lo costoso que puede resultar en el caso de animales con enfermedades virales o genéticas; o la falta de alternativas adecuadas con efectos secundarios mínimos; siendo un factor limitante que desencadena el continuo deterioro de salud de los pacientes. Por ello, se buscan nuevas alternativas, igual de efectivas y económicas para el tratamiento de las inmunosupresiones (Cárdenas, 2015).

Para estos problemas podemos encontrar una variedad de plantas medicinales, que según su especie cumplen un determinado objetivo; en el caso de la inmunosupresión, podemos ver que la *Uncaria tomentosa* o comúnmente llamada “uña de gato”, que presenta cualidades inmunoestimulantes gracias a sus componentes alcaloides presentes principalmente en corteza y raíz; además de presentar esta propiedad, también sirve como antiinflamatorio, antifúngico o antitumoral; por lo que, podríamos usarlo como parte de la terapia de sostén en el caso de enfermedades que lleven a la inmunosupresión del animal (López, 2006).

Resaltando las cualidades inmunoestimulantes de la *Uncaria tomentosa*, podríamos implementar un nuevo tratamiento para este tipo de problemas, siendo éste de una elaboración más económica y accesible; por ello, el objetivo del presente trabajo es evaluar su efecto inmunoestimulante en ratas inmunosuprimidas, de manera que pueda utilizarse para el refuerzo de la respuesta inmunológica de los pacientes frente a patógenos o como método preventivo en pacientes sanos (Lamm y Sheng, 2001).

II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

2.1. Rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*)

2.1.1. Datos biológicos

Es necesario tener conocimiento sobre los datos biológicos de los ejemplares (Cuadro 1), sobre todo, si se tiene en mente realizar la crianza de manera manual, de esta manera realizamos un correcto manejo.

Cuadro 1. Valores biológicos de rata de laboratorio

Valor	Rata
Rango de peso macho adulto (g)	300-500
Rango de peso hembras adulta (g)	200-400
Edad de madurez sexual (días)	65-110
Frecuencia del ciclo estral (días)	4-5
Periodo de gestación (días)	20-22
Tamaño promedio de la camada (crías)	7-12
Edad de destete (días)	21

Adaptado de Pritchett-Corning y otros (2011).

2.1.2. Alimentación

Los animales deben tener a su disposición una fuente de alimento que cumpla con los requerimientos alimenticios de acuerdo a la etapa en la que se encuentre, los cuales, no deben contener ningún contaminante biológico o químico, mayormente para poder tener una buena calidad de alimento debe ser almacenado a temperatura de 4°C. La vitamina C en los concentrados caduca luego de 3 meses, por lo que, es necesario la suplementación de vitamina C en animales donde se esté suministrando un concentrado de más del tiempo establecido (National Academy Press, 1996).

Podemos notar que a medida que la rata crece va consumiendo mayores gramos de alimento por día (Cuadro 2), y dependiendo del gasto de

energía que haga diario, se sumaría más gramos a la dieta, por lo que se le administrará alimento Biovita (Cuadro 3) cumpliendo con los requerimientos de macronutrientes necesarios (Hau y Van Hoosier, 2003).

Cuadro 2. Estimación promedio de ingesta de comida (g/día).

Especies	Crecimiento	Adulto	Preñada	Lactancia
Ratón	3-5	5-7	6-8	7-15
Rata	8-25	25-30	25-35	35-65

Adaptado de Hau y Van Hoosier (2003).

Cuadro 3. Composición nutricional del alimento balanceado BIOVITA.

Componente	Cantidad
Proteína cruda	17%
Humedad	13.0%
Calcio	0.85%
Grasa cruda	5.0%
Fibra cruda	5.0%
Fósforo	0.45%

Fuente: Agroindustrias Florida SAC (2020).

2.1.3. Ambiente

Para poder tener conocimiento del espacio necesario para el animal, según National Academy Press (1996), no solo se necesita considerar el peso corporal o el área de superficie de éste, sino de otros factores, pero se recomienda, a base de experiencia y en juicio, usar una serie de datos teniendo como base solo peso corporal, de esta manera sacamos el área que necesita y la altura. El mínimo espacio que el animal puede tener debe ser suficientemente amplio como para que voltee y pueda expresar posiciones normales, evitando que éstos, tengan estrés. El área usada por los bebederos, comederos, nidos, entre otros, no debe contar como parte del área del piso.

La temperatura en homeotermos expuestos a temperaturas mayores a 29.4°C o debajo de 4.4°C, sin la posibilidad de que puedan refugiarse, podría significar futuros problemas clínicos. Por lo que, es importante controlar la temperatura a la cual se va a exponer el grupo de roedores, según el procedimiento que se va a realizar, en el caso de utilizar alguna sedación o realizar un procedimiento que provoque en el animal una hipotermia, deberá mantenerse a los animales en una jaula con una temperatura ambiental alta. En el caso de roedores y lagomorfos podemos utilizar temperaturas entre 18 a 26°C, siendo recomendable evitar los cambios constantes de temperatura y así tener gastos innecesarios de energía. La humedad debe estar dentro del rango de 30 a 70% (National Academy Press, 1996).

Tener una ventilación adecuada ayudará a reducir los gases tóxicos como el amoníaco, al igual que un cambio de cama de manera regular; es recomendable la entrada de 50% de aire nuevo en la habitación, pero que, a la vez, no sea de alto grado de movimiento porque podría llegar a causar incomodidad en el animal (National Academy Press, 1996).

Debido a que los roedores tienen carácter nocturno y algunas ratas, en especial las albinas, son susceptibles a la retinopatía fototóxica, los niveles de iluminación no son muy necesarios de evaluar, de preferencia tener las jaulas en ambientes no muy iluminados (National Academy Press, 1996).

2.1.4. Recolección de muestras

Según el Instituto de Biología y Medicina Experimental (2017), dependiendo de la cantidad de sangre que se quiera recolectar se usará determinada vía, ya que las limitaciones de volúmenes de algunas son acordes al tamaño de la vena o arteria (Cuadro 4). Para el diagnóstico tan solo es necesaria una muestra de 0.3 a 1 mL.

Cuadro 4. Volumen máximo de extracción de sangre de *R. norvegicus*.

Especie	Corte de cola	Vena yugular	Vena de la cola	Submandibular	Punción cardiaca
Rata	50-200 uL	1-2 mL	1-2 mL	1-2 mL	7.5-15 mL

Fuente: IBYME (2017).

2.1.5. Valores hematológicos

Es necesario conocer los valores hematológicos de los ejemplares, siendo diferentes tanto en machos como hembras de edad adulta (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores hematológicos de las ratas de laboratorio *Rattus norvegicus* hembras y machos.

Parámetros	Hembras	Machos
	Rango de edades (semanas)	
	15 - 22	15 - 22
Hemoglobina (g/dl)	11.49 – 15.18	12.64 – 15.52
Hematocrito (%)	31.4 – 39.4	32.7 – 45.0
Conteo de eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5.81 – 7.19	6.03 – 8.10
Reticulocitos (%)	2.30 – 3.65	2.16 – 3.48
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	474 - 895	438 – 916
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2.88 – 8.19	3.84 – 10.74
Neutrófilos (%)	3.88 – 12.79	0 – 14.5
Linfocitos (%)	83.64 – 96.93	83.51 – 97.13
Monocitos (%)	0 - 2	0 – 2.5
Eosinófilos (%)	0 - 1	0 – 1
VCM: Volumen Corpuscular Medio (fL)	51.3 – 56.2	48.6 – 55.6
HCM: Hemoglobina Corpuscular Media	19.4 – 22.7	18.2 – 22.2
CHCM: Concentración de hemoglobina Corpuscular Media	36.9 – 41.3	36.7 – 40.6

Fuente: González y otros (2011).

2.2. Respuesta inmune

2.2.1. Órganos linfoides primarios y secundarios

Los órganos linfáticos primarios son puntos donde los linfocitos adquieren la madurez suficiente para poder funcionar correctamente, son denominados “órganos generadores”, en el caso de que el animal sea adulto (Abbas y otros, 2008).

El principal productor de linfocitos es la médula ósea, dando lugar a la maduración de los linfocitos B, en sí, este órgano se encarga de la producción de toda célula sanguínea en adultos, ya que si hablamos de neonatos vendrían a protagonizar otro tipo de órganos linfoides. A medida que el animal crece, la hematopoyesis se da en huesos planos como vertebras, costillas, entre otros. Los precursores de las células sanguíneas maduran en la médula roja y alcanzan los vasos sanguíneos. Cuando este órgano se encuentra en un estado no favorable o la demanda sobre la producción de células sanguíneas es excepcional, el organismo recurre a reincorporar órganos a su función hematopoyética como el hígado y el bazo, a este fenómeno se le llama “hematopoyesis extracelular” (Abbas y otros, 2008).

Otro órgano primario es el timo donde principalmente sucede la maduración de los linfocitos T. Este órgano es de forma lobulada y su ubicación anatómica es en el mediastino parte anterior, su estructura consta básicamente de corteza externa y médula interna, ambas necesarias para el proceso de maduración linfocítica, los LT llegan en forma inmadura y se alojan en la corteza del timo, por esta razón, podemos ver grandes poblaciones de timocitos (LT inmaduros) que se puede visualizar en el microscopio de color azul intenso, al ir madurando, van hacia la médula, evidenciándose una menor población y la muestra va a una tinción más clara (Abbas y otros, 2008).

El bazo es un órgano donde se albergan grandes poblaciones de linfocitos, se pueden ver estructuras como pulpa blanca rodeada por arterias centrales; alrededor de ésta se encuentran en su mayoría linfocitos T, reciben el nombre de vainas linfáticas periarteriolares. Se distingue, además, la zona marginal, que se inicia en el límite de la pulpa blanca, poblada de gran cantidad de linfocitos B y macrófagos. La pulpa roja contiene tanto eritrocitos como células dendríticas hasta macrófagos que tienen como función limpiar la sangre, funcionando el bazo como un filtro para bacterias intracelulares (Abbas y otros, 2008).

2.2.2. Inmunidad innata y células

El organismo hace frente a patógenos mediante varias barreras de defensa, siendo la primera, la barrera físico-química, que hace referencia a la piel, la cual está en constante cambio de células escamosas, garantizando seguridad en el organismo, mucosas las cuales retienen a los agentes patógenos para luego expulsarlos o eliminarlos, secreción de glándulas tanto sudoríparas como sebáceas, que al contener ácidos grasos, éstos crean un ambiente inhabitable para las bacterias por su bajo pH, además de que al haber cicatrices o heridas abiertas, el organismo cerrará las heridas formando costras para que no haya posibles infecciones en el futuro. También podemos encontrar otros métodos de protección como el vómito, diarrea, la secreción de HCl del estómago para eliminar bacterias presentes en el alimento, entre otros. De esta manera, el organismo vuelve la entrada de patógenos casi imposible (Campos, 2014).

Hablamos de la respuesta inmune inespecífica que, sin tener células de memoria como la respuesta específica, se usa con mucha frecuencia y de manera indiscriminada (Mariscal y otros, 1999). Podemos resaltar que los componentes de este sistema son: las barreras ya mencionadas, glóbulos blancos (leucocitos), proteínas y citocinas, siendo los más importantes los neutrófilos, otros fagocitos y células natural killer (NK) ya que se encargan de atacar al patógeno

como primera línea de defensa celular, y en el caso de los dos últimos estimulan el proceso de inflamación, entre otras funciones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Componentes de la inmunidad innata y sus funciones

Componentes	Funciones principales
Barreras	
Capas epiteliales	Impedir la entrada de los microbios.
Defensinas/catelicidina	Destrucción de los microbios.
Linfocitos intraepiteliales	Destrucción de microbios.
Células efectoras circulantes	
Neutrófilos	Fagocitosis y destrucción inicial de microbios.
Macrófagos	Fagocitosis y destrucción eficiente de los microbios, secreción de citocinas que estimulan la inflamación.
Linfocitos NK	Lisis de células infectadas, activación de los macrófagos
Proteínas efectoras circulantes	
Complemento	Destrucción de los microbios, opsonización de los microbios, activación de los leucocitos.
Lectina de unión a la manosa (Colectina)	Opsonización de los microbios, activación del complemento (vía lectina)
Proteína C reactiva (pentraxina)	Opsonización de los microbios, activación del complemento.
Citocinas	
FNT, IL-1, quimiocinas	Inflamación
IFN- α , β	Resistencia a la infección vírica.
IFN- γ	Activación de los macrófagos.
IL- 12	Producción de IFN- γ por los linfocitos NK y T
IL- 15	Proliferación de linfocitos NK
IL- 10, TGF β	Control de la inflamación

Fuente: Abbas y otros (2008).

2.2.3. Inmunidad adquirida: Humoral y celular

Hay bacterias que pueden resistir y penetran las barreras físico-químicas del organismo, por lo que entra en acción células que poseen un receptor de reconocimiento de patrones, los cuales llegan a reconocer los patrones

moleculares asociados a patógenos de estos agentes, y de esta manera se activan los patrones de respuesta adquirida (Campos, 2014)

La respuesta adquirida se activa cuando hay microorganismos infecciosos y su respuesta se basa en los linfocitos como células principales, siendo más específica a una gran variedad de macromoléculas que la inmunidad innata, también incrementa la respuesta dependiendo al grado o la constancia de exposición al patógeno; se divide en celular y humoral (Abbas y otros, 2008).

La inmunidad celular responde a los linfocitos T que actúan cuando hay presencia de microbios fagocitados por macrófagos y en patógenos intracelulares, siendo el caso primero, los linfocitos T helper activan la supresión del patógeno fagocitado en el macrófago y en el caso de microbios intracelulares, los linfocitos citotóxicos se encargan de destruir a la célula infectada. Podemos ver que hay 3 tipos de linfocitos T CD4; los TH1 producen interleucina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) e interferón gamma (INF- γ), los TH2 sintetizan interferón 4 (IL-4), interferón 5 (IL-5), interferón 6 (IL-6) e interferón 10 (IL-10), los TH0 producen de manera no tan efectiva los mismos tipos de citoquinas) (Abbas y otros, 2008).

La inmunidad humoral está a cargo de los linfocitos B, que reconocen la presencia de las moléculas en la membrana del antígeno, se activan y se diferencian en células plasmáticas que producen gran cantidad inmunoglobulinas, como la IgG, IgA, IgM, IgD y IgE, éstas activan el complemento cuando se unen a células fagocíticas, mastocitos y basófilos (Mariscal y otros, 1999).

2.3. Inmunosupresión del paciente

2.3.1. Mecanismos

El sistema inmune tiene como principales células a los linfocitos, que, al madurar, desarrollan la característica de no atacar al propio organismo, si este proceso llega a fallar, estamos frente a un fenómeno autoinmune. Para estos casos el uso de inmunosupresores se ha vuelto un tratamiento muy efectivo en el caso de trasplantes de órganos o enfermedades autoinmunes. Éstos podrían llegar a provocar infecciones secundarias por inmunosuprimir de manera inespecífica al organismo (Mariscal y otros, 1999).

2.3.2. Ciclofosfamida

Este fármaco comprende dentro del grupo de los agentes alquilantes, los cuales bloquean la síntesis de ácidos nucleicos inhibiendo la división celular. Es muy común su uso para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, y efectivo si se usa en altas dosis, pero al mismo tiempo es limitante por su toxicidad severa (Zaidi y otros, 1990).

Como un inmunosupresor es muy usado principalmente en el trasplante de órganos y para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. El efecto inmunosupresor no solo abarca humanos, sino también animales de laboratorio, pero podemos ver que, en roedores, el uso de altas dosis puede generar toxicidad severa, con una función hematopoyética disminuida, cistitis hemorrágica, urotoxicidad, muchas veces resultando en muerte del animal (Zaidi y otros, 1990).

Las dosis bajas de este fármaco, en vez de producir una inmunosupresión termina elevando ciertas respuestas inmunes, como la producción de anticuerpos. Investigaciones probaron que a dosis de 25 mg/kg, producía efecto en poblaciones de células T lo cual provocaba la inmunosupresión. La ciclofosfamida, en general, reduce las poblaciones de células CD4⁺ y CD25⁺, pero

se llegó a demostrar que dosis menores a 20 mg/kg no produce diferencias en los niveles de inmunoglobulinas séricas, por lo que se recomienda usar dosis de 150 mg/kg como dosis inmunosupresora (Barrientos, 2009).

Sin embargo, investigaciones prueban que el rango de dosis inmunosupresoras efectivas en ratas y ratones van desde concentraciones de 50 mg/kg a los 150 mg/kg de peso vivo (Sin Mayor y otros, 2019).

2.4. Inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes son usados a la par de los tratamientos como coadyuvantes, de esta manera se controla mejor las infecciones y procesos parasitarios potenciando a lo que vendría ser un tratamiento principal con fármacos, y también evitando los efectos secundarios que podrían causar lesiones, además estimula las defensas de nuestro organismo a diferencia de los fármacos interferón β -1b, interferón β -1a que son inmunomoduladores comerciales y por ende, tienen un costo elevado (Cárdenas, 2015).

Cabe resaltar que, a diferencia de otros fármacos, se debe encontrar la dosis adecuada, ya que, a elevadas dosis, los inmunoestimulantes naturales podrían no tener efecto en el organismo y se debería a una sobreestimulación del sistema inmunitario o por un tema de competencia por los receptores (Cárdenas, 2015).

2.5. Uña de gato (*Uncaria tomentosa*)

Uncaria tomentosa conocida comúnmente como “Uña de gato” es una planta que crece en zonas tropicales o climas cálidos; es un arbusto trepador que hasta podría alcanzar los 20 metros de altura; posee gran cantidad de propiedades medicinales, como antifúngicas, antibacterianas, antiinflamatorias e

inmunoestimulantes; en humanos, se han usado para tratar enfermedades como gastritis, artritis reumatoide, gonorrea, cirrosis, entre otras enfermedades como las neoplásicas (Quintela y Ugaz, 2003).

Estudios prueban que tanto como el tallo, hojas y raíces, presentan propiedades biológicas; esta planta proviene de la familia *Rubiaceae* y del género *Uncaria*, dentro de este género también podemos encontrar otras especies con cualidades medicinales o compuestos similares a la *Uncaria tomentosa* como *U. guianensis*, *U. rhynchophylla* y *U. sinesis* (López, 2006).

2.5.1. Composición química

En investigaciones, es importante saber la taxonomía de esta planta para poder saber la clase de alcaloides contiene, en este caso, podemos encontrar alcaloides primarios y alcaloides secundarios, ambos siendo del grupo oxindol tetracíclico y pentacíclico (Obregón, 1995).

Además de los alcaloides también contiene heterósidos del ácido quinóvico, triterpenos, esteroleos y compuestos fenólicos, los cuales también tienen propiedades farmacéuticas (Obregón, 1995).

En su composición química también podemos encontrar azúcares como glucosa, fucosa, quinovosa, ramnosa y galactosa; es importante tener esta valoración de principios activos en cuenta junto con la cuantificación de los alcaloides individuales presentes en la corteza, ya que siempre es variable por distintos factores como diferencia de origen geográfico, la época o estación en la que fue recogida, la maduración o edad, entre otras variables (Obregón, 1995).

Se investiga el contenido de alcaloides en la corteza de la *Uncaria tomentosa* cultivada en distintos puntos de Ucayali- Perú (Cuadro 7), donde se puede ver que en suelos más ácidos y con mayor contenido de arena hay menor presencia de alcaloides en la corteza de la planta, en cambio, en suelos que tienen pH más alcalino y con presencia de mayor materia orgánica hay una mayor presencia de alcaloides totales; además, se puede ver también que en menor altitud

predomina el alcaloide tetracíclico, pteropodina, y en puntos de mayor altitud predomina el alcaloide pentacíclico, mitrafilina (Torrejón y otros, 2010).

Cuadro 7. Concentración de alcaloides en corteza de *Uncaria tomentosa* cultivada en distintas altitudes

Alcaloides	Localidades y sus altitudes			
	IIAP (Iquitos, Loreto)	Nuevo Ucayali	El Porvenir	Tres de Octubre
	136 msnm	286 msnm	385 msnm	884 msnm
Especiofilina (%)	0.016		0.959	0.257
Mitrafilina (%)	0.412	0.286	*1.124	*3.904
Uncarina F (%)	0.114	0.082	0.047	0.076
Pteropodina (%)	*2.816	*10.828	0.421	1.398
Isomitrafalina (%)				
Rincofilina (%)	1.123			
Isorincofilina (%)				
Isopteropodina (%)				
Total	4.481	11.196	2.551	5.635

* Alcaloide mayoritario en cada localidad

Fuente: Torrejón y otros (2010).

Por otro lado, encontramos estudios farmacológicos usando la corteza de la planta para propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, esto sucede, debido a la sinergia en la que trabajan los compuestos de la uña de gato, por ese motivo, se recomienda no aislar los compuestos, por el contrario, utilizar en las pruebas el extracto completo y así potenciar el efecto que se busca (Obregón, 1995).

Tenemos a compuestos que presentan mayor acción antiinflamatoria como el heterópsido de ácido quinóvico, y los que potencian al efecto mencionado, como bsitosterol, estigmasterol, campesterol, que son esteroides produciendo una actividad antiinflamatoria moderada; el extracto de corteza también se encarga de

los radicales libres y el estrés oxidativo, que normalmente vemos en inflamaciones crónicas, degradando al oxidante celular mediador de la inflamación como el peroxinitrito, y neutraliza los efectos de los radicales libres evitando una muerte celular inducida por radiación (Quintela y Ugaz, 2003).

2.5.2. Alcaloides presentes en la planta

Los alcaloides son metabolitos que contienen átomos de nitrógeno y de carbono en su estructura, son muy conocidos por sus efectos farmacológicos (Cuadro 8); éstos se pueden sintetizar a partir de los aminoácidos como la lisina, triptófano y tirosina. Su finalidad ha sido objeto de estudio últimamente, concluyendo que, sirve como medio de defensa contra animales depredadores, ya que posee alta toxicidad y una capacidad disuasiva (Hartmann, 1992). Esta planta presenta dos grupos de alcaloides (López, 2006).

- Indólicos:
 - Gambirtanina
 - Dihidrogambirtanina
 - Hirsutina
- Oxindoles:
 - Tetracíclicos:
 - Rinchofilina
 - Isorinchofilina
 - Pentacíclicos:
 - Mitrafilina
 - Isomitrafilina
 - Isopteropodina
 - Pteropodina
 - Uncarina

Cuadro 8. Propiedades farmacológicas de alcaloides encontrados en la planta *Uncaria tomentosa*.

N°	Constituyente activo	Aplicación
1.	Ésteres de ácido quínico	Antiinflamatorio
2.	Rinchofilina (Alcaloide)	Inhibe la trombosis y la agregación plaquetaria
3.	Isopteropodina (Alcaloide)	Inmunoestimulante
4.	Krallendom	Anticancerígeno
5.	Alcaloides oxindólicos pentacíclicos	Propiedades antiinflamatorias y inmunomoduladoras
6.	Proantocianidinas (procianidinas oligoméricas)	Antioxidante
7.	Ácido cafeico (ácidos fenólicos)	Antioxidante
8.	Mitrafilina	Hipotensor
9.	Beta-sitosterol, estigmasterol, campesterol	Propiedades antiinflamatorias
10.	Isopteropodina y pteridina (alcaloide)	Estimula la fagocitosis in vitro
11.	Uncarina F	Efecto antitumoral
12.	Saponinas triterpenoides	Efecto antitumoral
13.	Hirsutina e Hirsuteina	Propiedades anti convulsivas en ratones
14.	Pteropodina e Isopteropodina	Moduladores positivos para receptores muscarínicos.

Adaptado de Chauhan y otros (2015).

Por medio del test de los granulocitos (investigada por Brandt) se midió la actividad defensiva de los glóbulos blancos, y se concluyó que los alcaloides mitrofilina y rynchofilina no mostraban actividad alguna in vitro, pero los alcaloides pteropodina, isomitrofilina e isorynchofilina mejoraban la actividad fagocítica de las células en un 50% (Wagner, 1998).

Según López (2006) los alcaloides oxindólicos tetracíclicos (AOT), (rynchofilina e isorynchofilina) actúan a nivel del sistema nervioso central, mientras que, los alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP) actúan sobre el sistema inmunitario, así mismo, los AOT inhiben la actividad de los pentacíclicos sobre células endoteliales e inhibidores de la actividad inmunoestimulante que este alcaloide ofrece.

Ambas clases de alcaloides podemos encontrarlos en la planta, por lo que, muchos preparados separan estas dos clases en libre de alcaloides tetracíclicos (TOAF) y libre de alcaloides pentacíclicos (POAF), de esta manera se pueden evitar la interacción dosis dependiente que hay entre los AOP y AOT, ambas clases de preparados funcionan de acuerdo al tratamiento, en enfermedades autoinmunes se puede aplicar el quimiotipo POAF, y en el caso de ayudar a la estimulación inmunitaria del animal, se usa el quimiotipo TOAF (Ortega, 2006).

La eficacia de la fagocitosis y la producción de la actividad inmunoestimulante se debe al porcentaje del contenido y tipo de alcaloides, además de las sustancias adicionales que se encuentren presentes al momento de administrar vía oral (Wagner, 1998).

2.5.3. Aplicaciones farmacológicas

Sucedan procesos como la inactivación de Factor nuclear kappa B (NF-KB) el cual es un factor que activa genes encargados de la respuesta antiinflamatoria y la regulación de la apoptosis, de esta manera podría disminuir el crecimiento tumoral por lo que se dice que la planta tiene propiedades antitumorales, importante en la expresión de más de 28 genes involucrados en la inflamación (genes proinflamatorios), la inhibición de la producción de TNF- α (Factor de necrosis tumoral), la cual es una citoquina que funciona como mediador del desarrollo de inflamaciones crónicas; o de la expresión molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) que es una glucoproteína de adhesión en la quimio atracción de células inflamatorias hacia el tejido inflamado. Algunos autores también recalcan su función inhibiendo citoquinas como IL-1 e IL-6 (Núñez y otros, 2008).

También se demostró la actividad antiviral frente al virus de estomatitis vesicular y al rinovirus producida por la aplicación de heterósidos del ácido quinóvico, pero peligrosamente usando dosis cerca a citotoxicidad (Aquino,1989).

2.5.4. Efecto inmunoestimulante

De acuerdo a sus cualidades inmunoestimulantes se observa que, usando la dosis de 6mg/g de oxindoles totales estimula la producción de interleucinas 1 y 6, aumenta la población de monocitos y la fagocitosis de neutrófilos granulados y macrófagos, tanto en condiciones in vitro como in vivo (López, 2006).

La IL-1 ha demostrado tener una actividad similar al TNF, favorece el proceso de inflamación y la respuesta generada por la inmunidad innata, dependiendo de las cantidades excretadas, ya que en bajas dosis trabaja como mediador de la inflamación local y en mayores dosis estimula en la médula ósea la producción de leucocitos (en este caso neutrófilos) y plaquetas (Abbas y otros, 2008).

La IL-6, en el caso de la inmunidad innata se encarga de estimular la síntesis de proteínas contribuyendo a la fase aguda de la infección, y también la producción de neutrófilos; además, estimula el crecimiento de linfocito B ya diferenciados en productores de anticuerpos actuando en la inmunidad adaptativa; nuevos estudios señalan que inhibe la acción y producción de linfocitos T reguladores (Abbas y otros, 2008).

El efecto inmunoestimulante se debe a los alcaloides presentes en la planta, los cuales son compuestos orgánicos mayormente de origen vegetal que presentan en su estructura moléculas de nitrógeno; sin embargo, recientes estudios demuestran su actual presencia en pequeñas cantidades en insumos de origen animal (López, 2006).

2.5.5. Toxicidad y dosificación

Se demostró que no hubo signos de toxicidad en ratones, utilizando concentraciones máximas de la sustancia, de 80 mg/kg de extracto liofilizado con 0.05% de alcaloides durante 8 semanas y 160 mg/kg por 4 semanas, tampoco signos de toxicidad aguda cuando la dosificación era mayor o igual a 16g/kg y con la dosis de 1g/kg por 4 semanas seguidas (López, 2006). No hubo cambios en exámenes histopatológicos, siendo los resultados iguales a los del grupo de control; al aumentar la dosis a 1g/kg, los resultados fueron los mismos (Quintela y Ugaz, 2003).

Se demostró que no está asociada a problemas hepáticos, por lo que se cataloga como una planta altamente tolerada y segura (Piscoya, Rodríguez y otros, 2001).

Se ha reportado toxicidad crónica, produciendo un ligero aumento en el porcentaje de linfocitos y una disminución en el total de neutrófilos y granulocitos, pero, si el tratamiento continúa con la dosis letal, podría ocasionar paro respiratorio y ataxia, por los efectos que tienen los alcaloides sobre el sistema nervioso central, causando efectos negativos cronotrópos, inotrópos, inhibición de agregación de trombocitos y efectos sedantes (Reinhard, 1997).

2.5.6. Contraindicaciones

La Asociación Americana de Productos Herbales (AHPA), cataloga a la uña de gato una clasificación clase - 4 en los rangos de seguridad, lo que indica la insuficiente información científica para considerar la hierba 100% segura (Erowele y Kalejaiye, 2009).

Como *Uncaria tomentosa* tiene efectos inmunoestimulantes, está contraindicado su uso en pacientes antes y después de cualquier trasplante de órganos, médula ósea o de piel (Chauhan y otros, 2015). Asimismo, su uso puede

comprometer la fertilidad en mujeres que buscan quedar embarazadas, pero no es totalmente seguro para ser usado como un anticonceptivo (Williams, 2001).

Suspender su uso 10 días antes de cualquier intervención quirúrgica, está contraindicado en caso de úlcera péptica y gastritis, ya que debido al efecto ulcerogénicos de los taninos que contiene, se podría producir un empeoramiento en ambos casos (López, 2006). Se recomienda evitar tomar antiácidos al tomar dosis de uña de gato (Navarro y otros, 2006). Dosis altas de uña de gato podrían traer dolores abdominales o problemas gastrointestinales, incluyendo diarrea, discontinuar el uso o reducir la dosis si la diarrea persiste más de 3 a 4 días (Costa Bieski, 2006).

2.5.7. Otros estudios

Estudios al respecto, resaltan las propiedades inmunoestimulantes de *U. tomentosa*, al administrar en estado acuoso y procesado por liofilización en pacientes sanos, por seis semanas, en donde se observó el incremento del 8.8% del promedio normal de leucocitos (Sheng y Bryngelsson, 2000).

También se observó un aumento de la respuesta inmunológica de pacientes sanos al administrar una vacuna neumocócica (Lamm y Sheng, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La investigación se desarrolló en el distrito de Trujillo, provincia de Trujillo, región La Libertad. El distrito de Trujillo tiene una altitud de 34 m.s.n.m., la temperatura ambiental varía desde 14° en épocas de invierno, hasta 33° en meses como enero.

3.2. Animales de estudio

Se utilizaron 29 ratas blancas machos de 200 a 400 g, en edad adulta (entre 20 a 25 semanas) procedentes de la cría de padres obtenidos del bioterio de la Universidad Nacional de Trujillo, 5 de ellas se eutanasiaron al inicio del experimento y a las restantes se les aplicó los tratamientos

Las ratas provinieron del cruce de 3 machos con 6 hembras, y se los destetó a los 30 días desde su nacimiento; para ser separados en grupo de 2 ratas por ambiente.

3.3. Manejo y alimentación

Se usaron piensos de BIOVITA, para cubrir los requerimientos energéticos y disponibilidad de comida Ad Libitum, al igual que el agua, donde los sujetos de prueba tuvieron a disponibilidad las 24 horas. El pienso se repartió por ambas jaulas por igual.

3.4. Instalaciones

Se usaron las instalaciones especiales para ratas de laboratorio siguiendo la “Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio” de la Academia Nacional de Medicina (1999), evitando nuevas variables que afecten el resultado.

Cada grupo de estudio se instaló en jaulas de plástico, con cama de viruta, a temperatura ambiente, evitando que disminuya de 20°C. Recibieron la misma cantidad de horas de luz (aproximadamente 12 horas).

Se evitó exponer a las ratas a factores de estrés, ya que, esto pudo afectar en la prueba dando falsos resultados, por lo que, se adaptó un ambiente donde se evitó el contacto con cualquier factor, así también, se tuvo ventilado el lugar para evitar acumulaciones de gases.

3.5. Variable independiente

Tintura de Uña de gato (*Uncaria tomentosa*)

3.6. Tratamientos

Los experimentos se llevaron a cabo separando 4 grupos, en el primero solo se utilizó solución fisiológica siendo nuestro grupo de control negativo (sin cambios), el segundo se aplicó la ciclofosfamida y se administró solución vía oral siendo el control positivo (inmunodeprimido) y los últimos se aplicó la uña de gato vía oral (100 mg y 200 mg x kg respectivamente) y la ciclofosfamida.

- T1: Administración de solución fisiológica vía oral + administración de NaCl vía intraperitoneal (control negativo).

- T2: Administración de ciclofosfamida vía IP (50mg/kg en 2 dosis) + Administración de solución fisiológica vía oral (control positivo)
- T3: Administración de UT (100mg/kg) vía oral + administración de ciclofosfamida vía IP (50mg/kg en 2 dosis)
- T4: Administración de UT (200mg/kg) vía oral + administración de ciclofosfamida vía IP (50mg/kg en 2 dosis)

3.7. Variables dependientes

- Valores hematológicos (Hemograma)
- Conteo de células órganos linfoides (timo, bazo y médula ósea)

3.8. Procedimiento y metodología

3.8.1. Administración del extracto de uña de gato

Se administró a la misma hora todos los días, un máximo de concentración 100 mg/kg/día y 200 mg/kg/día, el extracto tiene concentración del 20% (200 mg de corteza de uña de gato en 1 mL de alcohol etílico 80%) obtenido de los Laboratorios Takiwasi ubicados en la ciudad de Tarapoto. Fue administrada desde el día 3 del experimento hasta el día 18 donde se suspendió la tintura para la toma de muestras final.

Se realizó la administración de la tintura por medio de una sonda, de esta manera, se asegura que el animal ingiera toda la dilución de la tintura más cloruro.

3.8.2. Proceso de inmunosupresión

Con la finalidad de inducir inmunosupresión en los animales, tres grupos (T2, T3 y T4) recibieron Ciclofosfamida a 2 dosis de 50mg/kg de peso vivo el día 2 y el día 10, inyectándolo por vía intraperitoneal, tomando como referencia

la bibliografía añadimos una segunda dosis para asegurar la inmunosupresión (Torres, 2008).

3.8.3. Toma de muestras

En el día 1 se realizó la eutanasia de 5 ejemplares para obtener datos base acerca del conteo de células de órganos linfoides, se usó HALATAL vía intramuscular para luego inyectar T-61 (agente eutanásico) vía intravenosa, evitando que el animal sienta dolor o molestia alguna.

En el día 3 se obtuvieron las primeras muestras sanguíneas para la realización de los hemogramas, usando un equipo de anestesia inhalatoria para la inmovilización del ejemplar con isoflurano, asegurando el menor estrés y una inmediata recuperación. Se realizó una punción intracardiaca de todas las ratas extrayendo un máximo de 0.5mL por cada ejemplar, recolectándolos en microtubos EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y transportándolo en un cooler hacia el laboratorio con un máximo de 4 horas desde la obtención de la muestra.

Posteriormente, se realizó el mismo método de toma de muestras sanguíneas en el día 18. Al igual que la eutanasia el día 18 de los ejemplares para la observación de la celularidad de los órganos linfoides.

3.8.4. Exámenes de laboratorio

- **Hemograma**

Para la obtención de resultados se transportó al laboratorio Vet Center, donde se procesó las 48 muestras en total recolectadas en microtubos con EDTA.

- **Conteo de la celularidad de órganos linfoides:**

Se usó el Manual de Inmunología de la Universidad de Granada; siguiendo el protocolo de disección, extrayendo de manera cuidadosa el bazo,

timo, y médula ósea de un hueso largo (fémur) y se procedió a realizar lo siguiente:

- Se colocó el órgano en una placa Petri, el cual se disgregó con 8 ml de solución Turk.
- Con una micropipeta se tomó 10 μ l.
- Se colocó en la cámara de Neubauer solamente 10 μ l de la mezcla.
- Se llevó al microscopio, para observar, primero a 10x para localizar la cuadrícula, luego a 40x para realizar el conteo, aplicando la fórmula para el resultado final:

$$N^{\circ} \text{ de células } \times 10^3 / \text{mm}^3 = \frac{N^{\circ} \text{ de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes } \times \text{espesor } \times 1000} \times \text{dilución}$$

Donde:

Espesor: 0.1mm

3.9. Condiciones éticas

El experimento se realizó dentro de lo establecido en la “Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”, con establecimientos que cumplan bienestar animal y manejo adecuado.

3.10. Análisis estadístico

Se distribuyeron a los sujetos al azar, con 4 tratamientos y 3 repeticiones, con 2 ratas en cada unidad experimental. Los resultados fueron sometidos al análisis de varianza y a la prueba de Tukey.

IV. RESULTADOS

4.1. Valores hematológicos

a) Serie Roja

En el Cuadro 9 se muestran los promedios de los valores hematológicos iniciales en la serie roja, de las 24 ratas (machos), separadas en los 4 tratamientos, comparados con los valores de referencia normales en estas especies; pudiéndose observar que todos los grupos, en la mayoría de parámetros, se encontraban dentro de los valores normales, sin diferencias significativas entre grupos.

Cuadro 9. Valores iniciales de parámetros de la serie roja, según tratamientos

Parámetros	Promedio por Tratamiento				Valores de Referencia
	T1	T2	T3	T4	
Hematocrito (%)	43.93 ± 3.34a	44.28±3.66a	44.52 ± 2.75a	45.87±1.79a	31.4 - 45.0
Hemoglobina (g/dl)	14.33 ± 1.20 a	14.28± 1.19a	14.73±0.78a	14.80±0.59a	11.49 - 15.52
Eritrocitos (ul)	7.35 ± 0.63a	7.30±0.49a	7.67±0.53a	7.60±0.30a	5.81 - 8.10
VCM (fl)	60.2 ± 1.04a	60.7±3.26a	62.47±2.10a	60.47±1.62a	48.6 - 56.2

*Medias con una letra común en cada fila no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

para la prueba de Tukey. T1: Solución salina (control), T2: ciclofosfamida + sol. Salina, T3: ciclofosfamida + UT 100mg/kg, T4: ciclofosfamida + UT 200mg/kg

El cuadro 10 muestra el promedio de los valores de la serie roja de los ejemplares al final del experimento a los 15 días de la primera aplicación de la tintura de Uña de gato, tomando los mismos valores de referencia de la literatura, no hubo cambios significativos entre los grupos de tratamientos.

Cuadro 10. Valores finales de parámetros de la serie roja, según tratamientos.

Parámetros	Promedio Por Tratamiento				Valores De Referencia
	T1	T2	T3	T4	
Hematocrito (%)	44.02 ± 3.34 a	41.70±0.87	42.22 ± 4.50a	40.60±1.98a	31.4 - 45.0
Hemoglobina (G/Dl)	14.13 ± 1.56a	13.47± 0.28a	13.65±1.47a	13.10±0.64a	11.49 - 15.52
Eritrocitos (U)	7.09 ± 0.84a	6.87±0.30a	6.91±0.68a	7.67±0.34a	5.81 - 8.10
VCM (Fl)	61.77 ± 2.96a	60.87±2.74a	61.17±1.47a	60.52±1.65a	48.6 - 56.2

* Medias con una letra común en cada fila no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) para la prueba de Tukey, T1: Solución salina (control), T2: ciclofosfamida + sol. Salina, T3: ciclofosfamida + UT 100mg/kg, T4: ciclofosfamida + UT 200mg/kg..

b) Serie blanca

En el Cuadro 11 se muestran los promedios de los valores hematológicos iniciales de la serie blanca, pudiendo encontrar ligeros aumentos con respecto a los valores promedio de monocitos, eosinófilos y neutrófilos, sin diferencias significativas entre grupos.

Cuadro 11. Valores iniciales de parámetros de la serie blanca y plaquetaria, según tratamientos

Parámetros	Promedio por Tratamiento				Valores de referencia
	T1	T2	T3	T4	
Leucocitos (k/ul)	12.03 ±10.52a	9.70 ± 3.87a	7.03±1.27a	7.98±2.02a	2.880 - 10.740
N. Segmentados (k/ul)	3.73 ± 3.26a	3.01 ± 1.20a	2.18±0.39a	2.45±0.62a	5 - 20 % (0.34-2.148 k/ul)
N. Abastionados (k/ul)	0.24 ± 0.21a	0.19 ± 0.08a	0.14±0.03a	0.16±0.04a	0 - 1 % (0-0.18 k/ul)
Linfocitos (k/ul)	7.22 ± 6.31a	5.82 ± 2.32a	4.22±0.76a	4.79±1.21a	83.51 - 97.13% (2.40-10.43k/ul)
Monocitos (k/ul)	0.60±0.53a	0.49 ± 0.19a	0.35±0.06a	0.40±0.10a	0 - 2.5% (0-0.27 k/ul)
Eosinófilos (k/ul)	0.24 ± 0.21a	0.19 ± 0.08a	0.14±0.03a	0.16±0.04a	0 - 1 % (0-0.18k/ul)
Basófilos (k/ul)	0 ±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0 - 1 % (0-0.18k/ul)
Plaquetas (u/l)	653.33±104.89a	808 ± 248.01a	732±166.67a	725.33±308.80a	438 - 916

*Medias con una letra común en cada fila no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

para la prueba de Tukey. T1: Solución salina (control), T2: ciclofosfamida + sol. Salina, T3: ciclofosfamida + UT 100mg/kg, T4: ciclofosfamida + UT 200mg/kg.

En el cuadro 12 se puede observar el promedio de los valores hematológicos de la serie blanca al final del experimento, obteniendo un descenso de leucocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas en los tratamientos T2, T3 y T4; con respecto al T1, resaltando el T4 como el más cercano a los valores iniciales, sin diferencias significativas con T1.

Cuadro 12. Valores finales de parámetros de la serie blanca y plaquetaria, según tratamientos

Parámetros	Promedio por Tratamiento				Valores de Referencia
	T1	T2	T3	T4	
Leucocitos (k/ul)	8.60 ±1.70b	4.79 ± 2.26a	4.88±2.59a	5.55±1.62ab	2.880 - 10.740
N. Segmentados (k/ul)	2.58 ± 0.51b	1.44 ± 0.68a	1.47±0.78a	1.67±0.49ab	5 - 20 % (0.34-2.148 k/ul)
N. Abastionados (k/ul)	0.00 ± 0.00a	0.00 ± 0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0 - 1 % (0-0.18 k/ul)
Linfocitos (k/ul)	5.59± 1.10b	3.11± 1.47a	3.17±1.68a	3.61±1.05ab	83.51 - 97.13% (2.40-10.43k/ul)
Monocitos (k/ul)	0.34±0.07b	0.19 ± 0.09a	0.20±0.10a	0.22±0.06ab	0 - 2.5 (0-0.27 k/ul)
Eosinófilos (k/ul)	0.09 ± 0.02b	0.05 ± 0.02a	0.05±0.03a	0.06±0.02ab	0 - 1 % (0-0.18k/ul)
Basófilos (k/ul)	0 ±0a	0±0a	0±0a	0±0a	0 - 1 % (0-0.18k/ul)
Plaquetas (u/l)	729.33±80.97a	602.00 ± 135.83a	649.17±60.84a	672.00±111.53a	438 - 916

*Medias con una letra común en cada fila no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) para la prueba de Tukey. T1: Solución salina (control), T2: ciclofosfamida + sol. Salina, T3: ciclofosfamida + UT 100mg/kg, T4: ciclofosfamida + UT 200mg/kg

4.2. Celularidad de órganos linfoides

En el cuadro 13, se puede observar la comparación de valores iniciales y finales de celularidad en el Bazo. No hubo diferencias significativas entre grupos; sin embargo, en los valores finales, hay una mayor producción celular en el T4, con respecto a los otros tratamientos.

Cuadro 13. Promedio de conteo celular en Bazo, según tratamientos

Tratamientos	Células x10 ³ /mm ³	
	Valor inicial	Valor final
T1	111.33a	97.87a
T2	118.89a	62.51a
T3	100.8a	95.28a
T4	125.85a	108.88a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) para la prueba de Tukey. **T1: Solución salina (control), T2: ciclofosfamida + sol. Salina, T3: ciclofosfamida + UT 100mg/kg, T4: ciclofosfamida + UT 200mg/kg

En el conteo final de células leucocitarias del bazo, se pueden observar que el T4 tuvo la mejor respuesta, con respecto a los otros tratamientos (Figura 1).

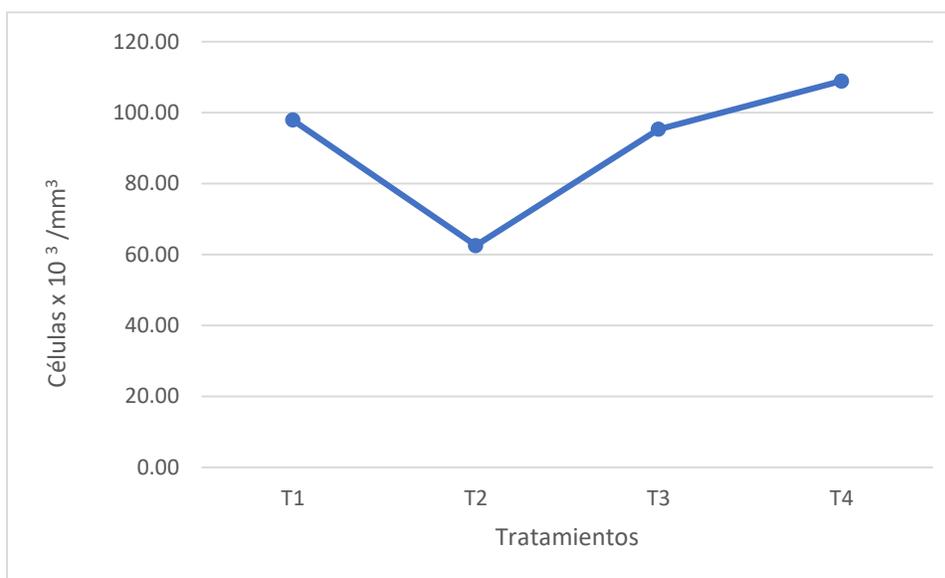


Figura 1. Promedio de conteo celular final en Bazo, según tratamientos

En el cuadro 14, se puede observar la comparación de valores iniciales y finales de celularidad en la Médula ósea, observando que los animales que fueron

sometidos al T4 (Ciclofosfamida + UT200mg/kg) presentaron mayor celularidad con respecto a los otros tratamientos, en los valores finales.

Cuadro 14. Promedio de conteo celular en Médula ósea, según tratamientos

Tratamientos	Células x10 ³ /mm ³	
	Valor inicial	Valor final
T1	23.52a	31.12a
T2	32.04a	18.88a
T3	21.75a	22.69a
T4	20.76a	23.33a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) para la prueba de Tukey. **T1: NaCl (control), T2: ciclofosfamida + NaCl, T3: ciclofosfamida + UT 100mg/kg, T4: ciclofosfamida + UT 200mg/kg.

Los resultados entre los tratamientos finales de las muestras tomadas de la Médula ósea (Figura 2.), se evidencia la curva de descenso de producción de linfocitos en todos los grupos, en comparación con el grupo de control T1 (NaCl); sin embargo, se observó un ligero aumento de celularidad en el T4 con respecto al T2 y T3.

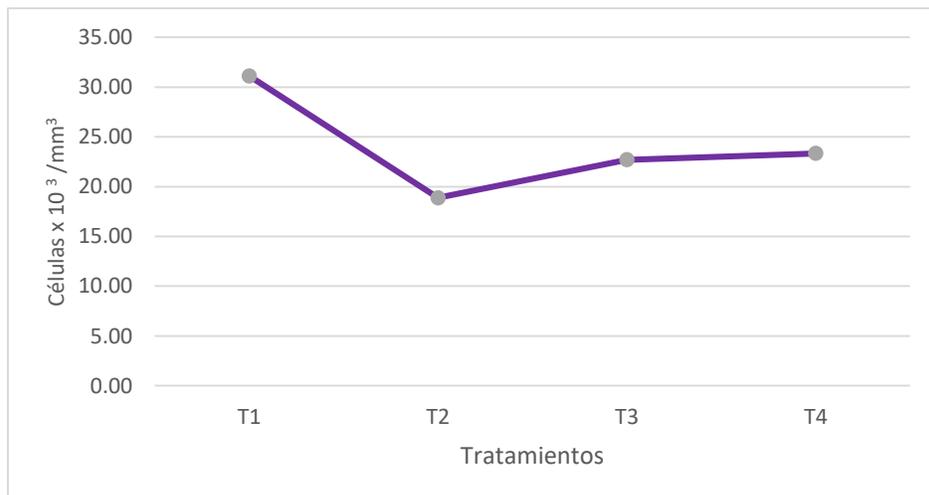


Figura 2. Promedio de conteo celular final en Médula ósea, según tratamientos.

Por último, con respecto al Timo, se evidencia un aumento no tan significativo de células leucocitarias con respecto a los valores iniciales de cada grupo; el T3 fue el que dio mejores resultados con respecto a los demás tratamientos. (Cuadro 15).

Cuadro 15. Promedio de conteo celular en Timo, según tratamientos

Tratamientos	Células x10 ³ /mm ³	
	Valor inicial	Valor final
T1	44.67a	63.55a
T2	40.56a	26.27a
T3	44.25a	49.79a
T4	33.81a	40.99a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) para la prueba de Tukey. **T1: NaCl (control), T2: ciclofosfamida + NaCl, T3: ciclofosfamida + UT 100mg/kg, T4: ciclofosfamida + UT 200mg/kg.

Se observa una disminución marcada del T2 con respecto al resto de tratamientos, el T3 y T4 muestran regeneración casi similar siendo el primero, el que marca mayor número de celularidad (Figura 3).



Figura 3. Promedio de conteo celular final en Timo, según tratamientos.

V. DISCUSIÓN

5.1. Valores hematológicos

a) Serie Roja

Con respecto a los valores iniciales en todos los tratamientos, se encontraron dentro de los parámetros establecidos según Gonzales y otros (2011), a excepción del valor corpuscular medio (VCM), que se encontró ligeramente aumentado, siendo aceptable ya que los valores pueden variar ligeramente según edad o situaciones de estrés.

En relación a los valores finales, no se hallaron diferencias significativas entre tratamientos, después del proceso de inmunosupresión y el uso de la Uña de Gato; esto coincide con Saavedra (2008), quien afirma que, en pollos de engorde, los valores hematológicos de la serie roja como eritrocitos y hemoglobina no son influenciados por la planta, de esta manera podemos corroborar que una de sus funciones no sería elevar parámetros eritrocitos.

b) Serie Blanca

Los valores iniciales tomados en el día 1 del experimento, se encontraron dentro de los valores normales establecidos para la especie, en todos los grupos. Al compararlos con los valores luego de la aplicación de los tratamientos, se observa una notoria disminución de la serie leucocitaria, luego de la aplicación de ciclofosfamida a 2 dosis de 50 mg/kg utilizada en los tratamientos T2 (grupo inmunosuprimido con ciclofosfamida), T3 (grupo inmunosuprimido con ciclofosfamida e inmunoestimulados con uña de gato 100 mg/kg) y T4 (grupo inmunosuprimido con ciclofosfamida e inmunoestimulados con uña de gato 200 mg/kg). Sobre la disminución de los valores del T1 (NaCl), si bien es cierto que no fue administrada la ciclofosfamida, se reemplazó por el uso de suero inyectado vía

intraperitoneal, lo que supone un estrés para el ejemplar, según estudios de Sánchez (2007), el estrés generalmente causa deficiencias en la inmunidad en los seres vivos; por lo que, cualquier estímulo inusual para el animal lo someterá a un estrés agudo o crónico, de esta manera es justificable los cambios en el T1 con ligeros signos de inmunosupresión, esto no afecta en la comparación de resultados ya que, todos los sujetos de prueba estuvieron expuestos a las mismas manipulaciones, por lo que, el factor de estrés estuvo presente en cada ejemplar.

En los promedios de valores finales, podemos observar que, en el parámetro de leucocitos, hubo diferencias significativas entre los tratamientos T1 (NaCl) con T2 (Ciclo + NaCl) y T3 (Ciclo + UT 100mg/kg), en el segundo caso, la aplicación de la ciclofosfamida inmunodeprimió a los animales, en el tercer caso, con la aplicación de la ciclofosfamida + UT, se mostró un ligero aumento, pero no tan cercano a los valores de los animales que no se inmunodeprimieron. Por otro lado, no se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el tratamiento T4 (Ciclo + UT 200mg/kg) con los demás, y fue el único que no mostró diferencias con T1, y esto significa que fue el que más se acercó a los valores de los animales control, demostrándose el mejor efecto de la Uña de gato a dosis (200mg/kg); este resultado coincide con Lamm y Sheng (2000) quienes demostraron resultados similares cuando aplicaron la tintura a dosis similares, donde, el promedio de leucocitos incrementó un 8.8%. En nuestro estudio se evidencia su efecto inmunoestimulante en el T4 a dosis de 200mg/kg, pudiendo aumentar en gran cantidad la producción de leucocitos con respecto a los valores obtenidos en el T2.

Según López (2006), el efecto inmunoestimulante de la Uña de gato, se debe sobre todo a los alcaloides pentacíclicos; por lo que, a mayor concentración de éstos, mayor acción de la tintura sobre el sistema inmunológico, esto significaría que se necesita una dosis mayor o igual a 200 mg/kg para que sus efectos inmunoestimulantes resalten o la predominancia de alcaloides pentacíclicos en la tintura administrada. Además, se ha descrito que la altitud influye en la

concentración de alcaloides, Torrejón (2010) habla sobre a mayor altitud mayor cantidad de alcaloides pentacíclicos, esto influiría, ya que, la tintura de *Uncaria tomentosa* usada fue proveniente del Laboratorio Takiwasi de la ciudad de Tarapoto con una altitud de 350 m.s.n.m.

Con respecto a los valores de neutrófilos segmentados y abastoados, vemos que en la toma final no hay presencia de abastoados, es decir, neutrófilos inmaduros, y hay una disminución de los N. segmentados. La ciclofosfamida causa mielosupresión, siendo un alquilante llega a causar leucopenia muy marcada en los días 10 a 15 de la administración del fármaco y comienza la regeneración de la médula ósea desde día 18, por lo que afecta en la producción de nuevos neutrófilos (Ferreiro y otros, 2003). De igual forma, se observó un ligero aumento de neutrófilos segmentados en los tratamientos T3 (Ciclo + UT 100mg/kg), y T4(Ciclo + UT 200mg/kg) , en comparación con el T2(Ciclo + NaCl), e igualmente que en el caso de leucocitos totales, el T4 fue el único que no tuvo diferencias significativas con el T1 (NaCl), siendo el que mostró mayor recuperación y se acercó más a los valores del grupo control.

Los animales que recibieron el T4 (Ciclo + UT 200mg/kg) mostraron mayor elevación de linfocitos a comparación de los demás tratamientos (sin diferencia significativa), siendo éste más próximo a los resultados de la primera toma de muestra y en relación al tratamiento control T1 (NaCl), esto coincide con la investigación de Klymenco y Bazica (1998) donde se observa la elevación de la población de linfocitos T y B en pacientes humanos con inmunodeficiencia, tratados con tintura de Uña de gato. A su vez, como la *U. tomentosa* estimula la producción de IL-6, ésta aumenta la diferenciación y maduración de linfocitos T y B, al igual que coestimula la producción y crecimiento de los precursores hematopoyéticos (Saavedra y otros, 2011). Así mismo, Sheng y otros (2000), encontraron una elevación en la cantidad de linfocitos y neutrófilos dosis-dependiente en ratas, a dosis de 40 mg/kg de Uña de gato por 8 semanas.

La tintura de Uña de gato también estimula la producción de IL -1 que ayuda a inducir la proliferación de linfocitos T y timocitos, causa neutrofilia y promueve la formación de progenitores mieloides. López (2006) informa sobre un aumento significativo de linfocitos en sangre periférica (a dosis de 1 g/kg por un periodo de 4 semanas). De esta manera podemos observar, que, aunque no muestren diferencias significativas tanto el T4 (Ciclo + UT 200mg/kg) como T3 (Ciclo + UT 100 mg/kg) hay una mayor producción de células con respecto al T2 (Ciclo + NaCl), indicando que, siendo grupos inmunosuprimidos, éstos llegan a elevar el parámetro de los linfocitos casi alcanzando los valores del T1 (NaCl).

Con respecto a los monocitos, se evidencia que no hay aumento en la cantidad de monocitos entre los valores iniciales y finales, pero comparando solo los tratamientos finales hay un ligero ascenso en los tratamientos T3 (Ciclo + UT 100mg/kg) y T4 (Ciclo + UT 200mg/kg), sin diferencias significativas entre este último y el T1 (NaCl). Lamm (2001) muestra que, al administrar C-Med-100 (350mg de extracto de Uña de gato en 2 tomas diarias por dos meses), produce una pequeña disminución de estos parámetros en humanos. Esto podría significar que la administración a corto plazo podría elevar la producción de monocitos, en cambio a largo plazo podría no ser relevante este cambio y mantenerse o disminuir. Además, podemos ver que el efecto de la Uña de gato sobre los monocitos se debe al alcaloide isopteropodine que aumenta la acción fagocítica y la activación de macrófagos (Groom, 2007), más no hay evidencia de que este estimule la producción de monocitos.

Con respecto a los eosinófilos, no se observan diferencias, esto coincide con Lamm (2001), que manifiesta que con la administración de Uña de gato a dosis 100 mg/Kg en ratas, no se demostró diferencias entre el porcentaje de eosinófilos al inicio como al final de los tratamientos, no hay evidencia de que la tintura de Uña de gato afecte en la producción de eosinófilos.

En cuanto al nivel de basófilos no hay diferencias significativas entre tratamientos. Por otro lado, no hay detalles en investigaciones de efectos sobre la población de basófilos en animales, Lamm (2001) describe un ligero aumento de esta población en humanos con la toma del suplemento C-Med 100 a base de uña de gato por 2 meses. En nuestro trabajo podemos observar que la toma inicial de muestras no hubo basófilos presentes y continuó así hasta la toma final, por lo que, no podemos asegurar su efecto de la tintura a este nivel.

Con respecto a las plaquetas, en los 4 tratamientos no hubo diferencias significativas, tanto en valores iniciales como finales. Abbas y otros (2008) afirman que el extracto de Uña de gato estimula la producción de interleucina 1, de esta manera, podría elevar la producción de plaquetas en sangre; podemos ver que, al usar la dosis de 100 mg/kg y 200mg/kg de tintura no llega a elevar los niveles de plaquetas en sangre, de requerirlo se podría usar dosis mayores.

5.2. Celularidad de órganos linfoides

Los resultados obtenidos del conteo de celularidad en el bazo, comparando valores iniciales y finales, se puede observar un descenso en la cantidad de células linfoides; no obstante, hay una creciente en la producción de células en el tratamiento el T4 (Ciclo + UT 200mg/kg) que incluso superó la celularidad del T1 (NaCl) a consecuencia de la demanda de células linfocíticas y la inmunoestimulación de la tintura; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre tratamientos.

Vega (2009) indica el protagonismo del bazo como auxiliar en la hematopoyesis junto con el hígado, cuando los órganos linfoides primarios no pueden abastecer la demanda o cuando se presencia un daño de médula ósea. Consiguiente a esto, podemos resaltar las propiedades de proliferación linfocítica

que otorga la tintura de UT y el papel que toma este órgano en un proceso de inmunosupresión al intentar producir linfocitos.

En el caso de la médula ósea los valores iniciales no son uniformes, en cambio, los valores finales muestran un aumento en el T3 (Ciclo + UT 100mg/kg) y T4 (Ciclo + UT 200mg/kg), aunque sin diferencia significativa. Según Tizard (2009) podemos encontrar mayor población de linfocitos en la médula ósea; ya que, aquí es donde se originan a partir de las células madres, además, la *Uncaria tomentosa* estimula la producción de estos precursores de los linfocitos gracias a los alcaloides pentacíclicos; por lo que, la comparación entre promedios en la toma de muestra final detalla la curva de descenso y mantenimiento de los tratamientos con la tintura UT, que al inmunosuprimir a los sujetos de estudio e inmunoestimular la celularidad de la médula ósea gracias al uso de alcaloides presentes en la planta, se pudo estabilizare incluso aumentar, en el caso del T2 que solo fue inmunosuprimido, la recuperación es más lenta y no tan efectiva a comparación de los T3 (Ciclo + UT 100mg/kg) y T4 (Ciclo + UT 200mg/kg).

Por otro lado, los valores iniciales de la celularidad del timo fueron uniformes, por lo que a comparación de los finales, hay una elevación tanto del T1 (NaCl) siendo el grupo control, como de los tratamientos T3 (Ciclo + UT 100mg/kg) y T4 (Ciclo + UT 200mg/kg), sin diferencia significativa entre grupos; según estudios de Marsán (2013) el timo vendría a ser uno de los órganos con mayor producción de linfocitos pequeños, aunque esta podría ir descendiendo en el periodo involutivo del timo a medida que el animal va creciendo, pero argumenta que aun este órgano continua siendo uno con mayor producción, por actividad mitótica de las células linfoides tímicas, este no se ve afectado en su producción por ninguna alteración de los demás órganos linfoides. Gracias a la estimulación de IL-6 podemos encontrar una mayor diferenciación de linfocitos, por lo que, mayor cantidad de linfocitos van a migrar de la médula ósea al timo para diferenciarse y madurar, por este hecho se puede encontrar que los tratamientos con UT se van nivelando con el T1. Se pudo observar también, que la dosis de 100mg/kg (T3), tuvo mayor efecto que la de

200mg/kg (T4); esto puede deberse a la regresión temprana del timo de algunos ejemplares del T4.

VI. CONCLUSIONES

- El uso de la tintura de *Uncaria tomentosa* a dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg vía oral, no mostraron variación sobre los parámetros de la serie roja, por lo que, no se puede asegurar su efecto en los parámetros eritrocíticos.
- A nivel de la serie blanca, se pudo probar la efectividad dosis-dependiente de la Uña de gato, elevando los parámetros de neutrófilos y linfocitos, siendo la dosis de 200mg/kg, la que mostró mejores resultados, acercando los valores de esta serie a los de un animal inmunocompetente.
- La *Uncaria tomentosa* aumentó la celularidad en médula ósea, bazo y timo (este último con resultados variados a causa de la involución del órgano en uno de los ejemplares en el T4), contrarrestando el proceso de inmunosupresión generado; el efecto sobre estos órganos es a dosis-dependiente, la dosis de 200 mg/kg presentó mejor efecto.

VII. RECOMENDACIONES

- Comparar el efecto de la tintura de Uña de gato en mayores dosis, para conseguir un mejor efecto inmunoestimulante.
- Se necesitaría investigar un nuevo tratamiento, en el cual solo se aplicaría la tintura de la uña de gato, mas no inmunodeprimir, de esta manera podemos estimar su potencia como inmunoestimulante en un animal completamente sano de manera preventiva.
- Ampliar el tiempo de prueba de la tintura por un periodo de 20 a 30 días, sin riesgo alguno de toxicidad ya que la bibliografía nos asegura la seguridad de esta planta, de igual manera, al ampliar el tiempo de administración, se podrían implementar una serie más de toma de muestras sanguíneas a la mitad del experimento.
- Evaluar el índice opsonofagocítico, ya que esa planta tiene como una de sus funciones potenciar la acción de los macrófagos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2008). *Inmunología celular y molecular* (6th ed.). Barcelona: Elsevier.
- Alvayay Barrientos, S. (2009). *Efecto De La Ciclofosfamida Sobre La Inflamación De Las Vías Aéreas En Un Modelo Murino De Hipersensibilidad* (Bachiller). Universidad Austral De Chile.
- Becker K., Ana. (2001). Interpretación del hemograma. *Revista chilena de pediatría*, 72(5), 460-465
- Bruton, L., y Parker, K. (2009). *Goodman & Gilman Manual de farmacología y terapéutica* (1st ed.). México: McGraw-Hill/Interamericana de México.
- Campos, C. (2014). El Sistema Inmune En Los Mamíferos: Las Defensas Del Cuerpo. *Nutrición Animal Tropical*, (8), 80-93.
- Cárdenas Ramírez, D. (2015). Medicina De Hoy: Estimular Defensas Como Coadyuvante En Prevención O En El Tratamiento De Enfermedades Infecciosas. *FAGROPEC*, (7), 41 - 44.
- Chauhan, R., Singh, V., Bajaj, H. y Bisht Chauhan, S. (2015). Cat's Claw: A Miracle Herb from The Rain Forest of Peru. *Indian Journal of Drugs*, (4), pp.96-101.
- Costa Bieski, I. (2006). Utilização de medicamentos fitoterápicos com ênfase na uncaria tomentosa(will) d.c., dispensados em farmácias de manipulação na grande cuiabá. minas gerais - brasil: lavras, p.76.
- Erowele, G. I., & Kalejaiye, A. O. (2009). Pharmacology and therapeutic uses of cat's claw. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 66(11), 992–995.

- Ferreiro, García, Barceló, & Rubio. (2003). Quimioterapia: efectos secundarios. *Gac Med Bilbao*, (100), 69-74.
- González, B., Blanco, D., Peña, A., Ronda, M., Goñi, L., Arteaga, M., Bada, A., González, Y. and Mancebo, A., 2011. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB. *Revista Electrónica de Veterinaria*, (12), pp.1-10.
- Groom, S. N., Johns, T., & Oldfield, P. R. (2007). The Potency of Immunomodulatory Herbs May Be Primarily Dependent upon Macrophage Activation. *Journal of Medicinal Food*, 10(1), 73–79.
- Hau, J., y Van Hoosier, G. (2003). *Handbook of Laboratory Animal Science* (2nd ed.). Washington, D.C: CRC Press.
- IBYME. (2017). Retrieved 16 September 2019, from <https://www.ibyme.org.ar/archivos/laboratorios/adjuntos/poe-vias-de-extraccion.pdf>
- Kathleen R. Pritchett-Corning, Aurélie Girod, Gloria Avellaneda, Patricia E. Fritz, Sonja Chou y Marilyn J. Brown. (2011). *Manual de signos clínicos en roedores y conejos*. Charles River Laboratories 1a Edición.
- Klymenko, M. Y Bazica, M. 1998. Informe sobre el resultado del uso del extracto liofilizado de *Uncaria tomentosa*. Centro de investigación en medicina de radiación de la academia de ciencias médicas de Ucrania. *Boletín INMETRA*. Lima, Perú. 18 p.
- Lamm, S. (2001). Persistent response to pneumococcal vaccine in individuals supplemented with a novel water soluble extract of, C-Med-100. *Phytomedicine*, 8(4), 267–274.

- López, T. M., 2006, Uña de gato “Características y perfil terapéutico”, *Offarm*, 25 (10): 104-108.
- Mariscal, O., Vargas, E., y Moreno, A. (1999). *Farmacología de la inmunosupresión*. UCM, (7), 123-137.
- Marsán Suárez, V., Valle Pérez, L., & Macías Abraham, C. (2013). Aspectos actuales de la organogénesis. Función e involución del timo. *Revista Cubana Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, (4), 349-358.
- Martin Cordero, A. (2019). *Corticoides y Ciclosporina*. Retrieved 13 September 2019, from <https://studylib.es/doc/2992739/corticoides-y-ciclosporina-dr-alberto-martin-cordero>.
- National Academy Press (1996). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.
- Nora Virginia, G. (1985). *Maduración de la competencia inmunológica en la rata* (Doctorado). Universidad de Buenos Aires.
- Obregón, L. E., *Estudios sobre la <<uña de gato>> (Uncaria tomentosa)*, *Natura medicatrix*, 1 (37-38): 72-78.
- Ortega, M. (2006). *Plantas medicinales para enfermedades reumáticas*, 1ed. Madrid, España, Complutense, 80 p.
- Paschall, A. V., Middleton, D. R., Avci, F. Y. (2019). *Opsonophagocytic Killing Assay to Assess Immunological Responses Against Bacterial Pathogens*. *J. Vis. Exp.* (146).
- Piscoya, J., Rodriguez, Z., Bustamante, S., Okuhama³, N., Miller, M. y Sandoval, M. (2001). *Efficacy and safety of freeze-dried cat's claw in osteoarthritis of the knee: mechanisms of action of the species Uncaria guianensis*. 50th ed. Basel: Birkhäuser Verlag, pp.442 - 448.

- Quintela, J.C., Ugaz, O.L. (2003). Uña de gato, *Uncaria tomentosa* DC. *Fitoterapia*, 3 (1): 5-16.
- Saavedra, 2008. Uso de uña de gato (*Uncaria* sp) en la etapa de acabado de pollos parrilleros. Tesis Ing. Zootecnista. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 38 p.
- Sheng, Y., Bryngelsson, C., & Pero, R. W. (2000). Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100™, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(2), 115–126.
- Sin Mayor, A., Díaz Gálvez, M., Sebazco Perna, C., & Jiménez Martínez, M. (2019). Evaluación de la actividad inmunomoduladora del polvo seco de *Punica granatum* Linn en un modelo experimental de inmunosupresión. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 48(2), 177-186.
- Taiz L., Zeiger E. (2007). *Fisiología vegetal*, 1ed. Castellón, España, Universitat Jaume, 558-562 p.
- Tizard, I. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria* (8th ed.). Barcelona: Elsevier España.
- Vega Robledo, G. (2009). *Inmunología para el médico general, Órganos Linfoides*. Facultad De Medicina, UNAM, (5), 234-236.
- Williams, J. (2001). Review of Antiviral and Immunomodulating Properties of Plants of the Peruvian Rainforest with a Particular Emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. *Alternative Medicine Review*, (6), pp.567-579.
- Zaidi, S., Singh, K., Raisuddin, Saxena, A., & Ray, P. (1990). Protein a Induced Abrogation of Cyclophosphamide Toxicity is Associated with Concomitant Potentiation of Immune Function of Host. *Immunopharmacology And Immunotoxicology*, 12(3), 479-512.

IX. ANEXOS

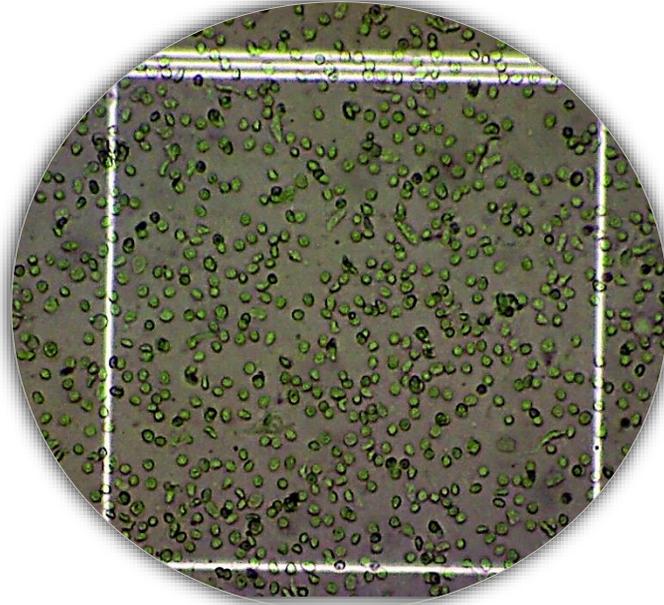
Anexo 1. Preparación de las ratas para la toma de muestra con anestesia inhalatoria.



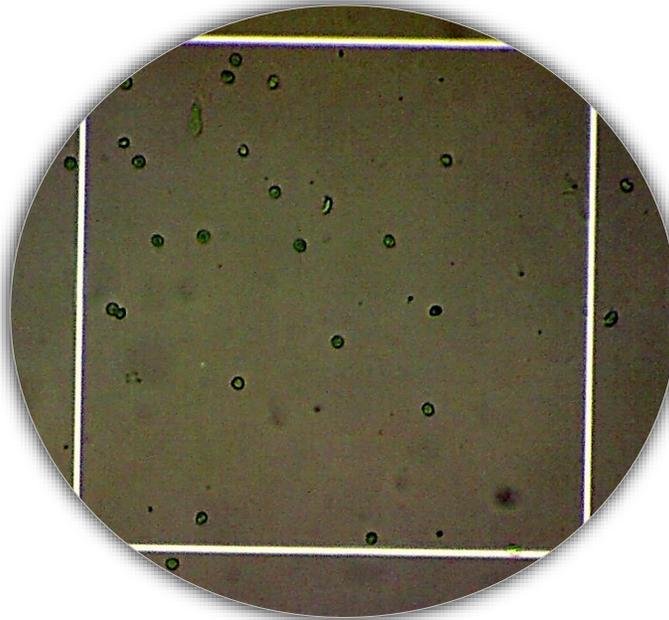
Anexo 2. Extracción de sangre por vía intracardiaca.



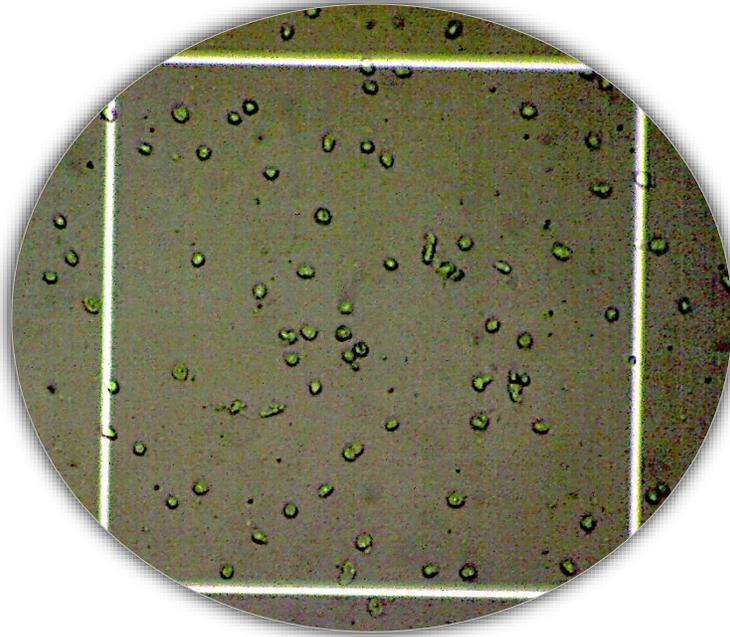
Anexo 3. Muestra de timo de rata sana.



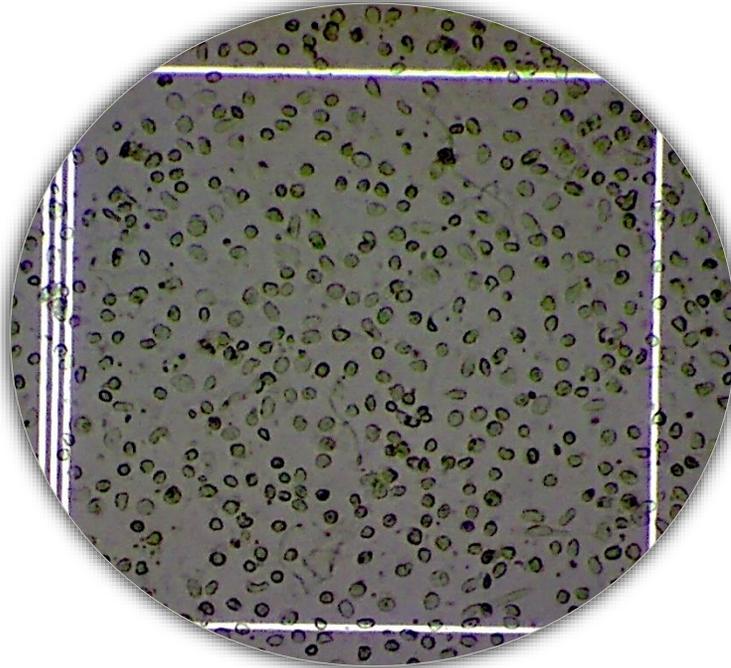
Anexo 4. Muestra de timo de rata inmunodeprimida.



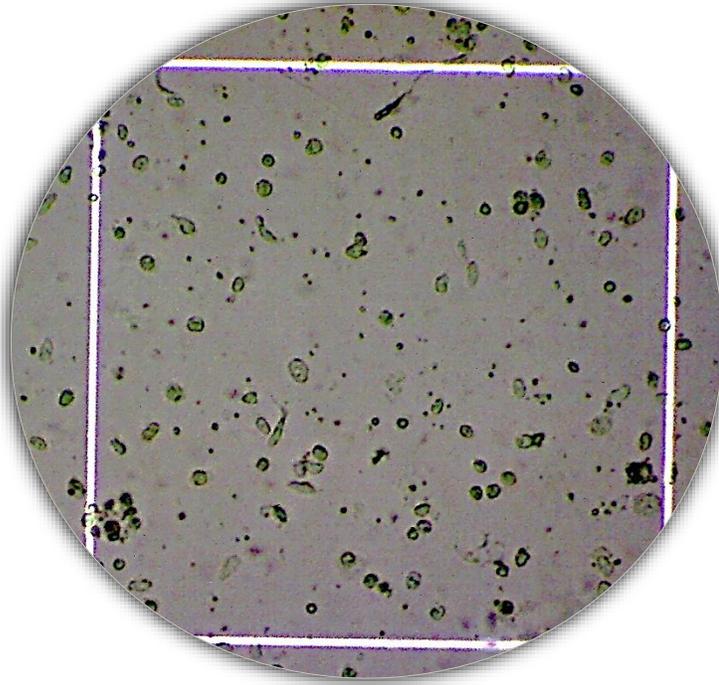
Anexo 5. Muestra de timo de rata inmunestimulada con uña de gato.



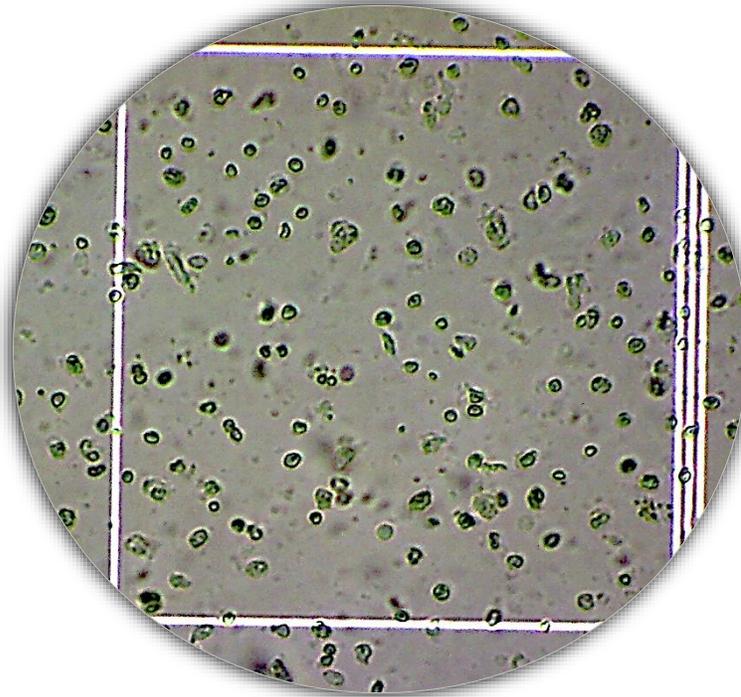
Anexo 6. Muestra de bazo de rata sana.



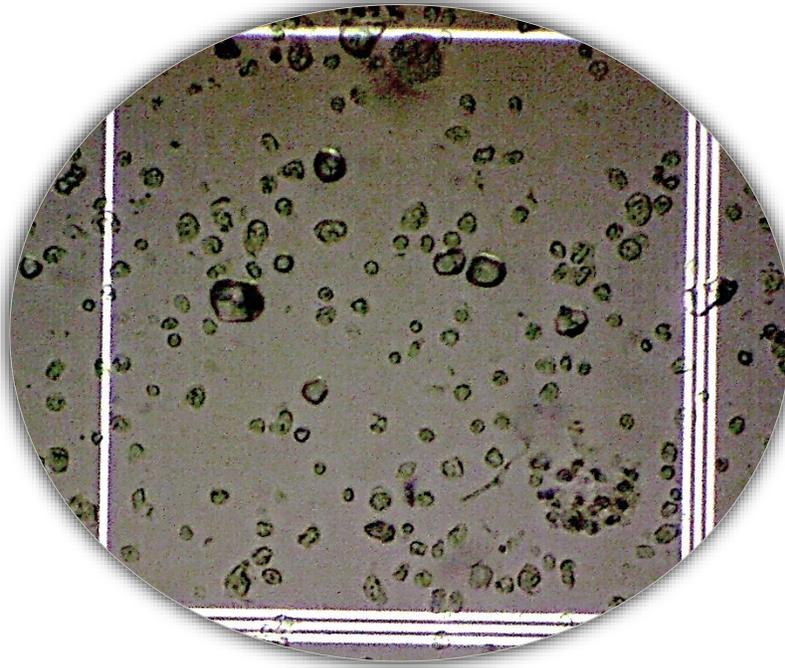
Anexo 7. Muestra de bazo de rata inmunodeprimida.



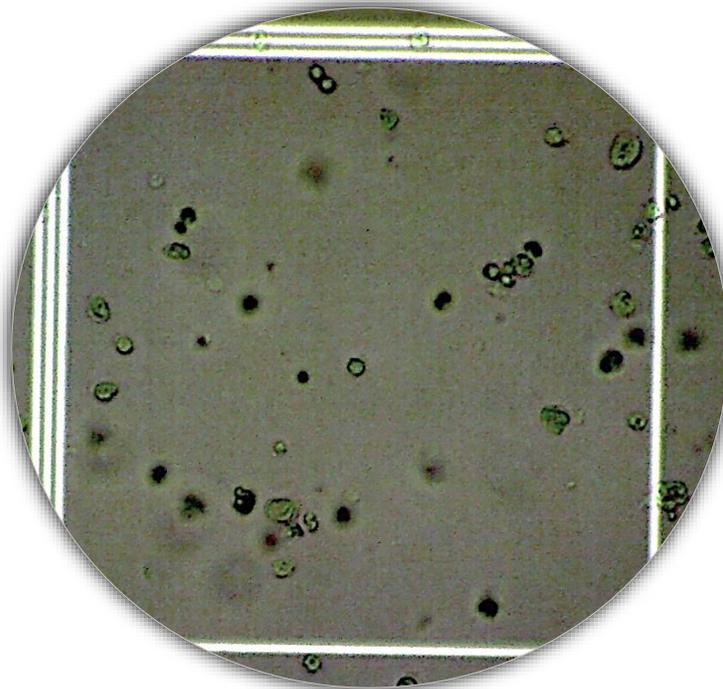
Anexo 8. Muestra de bazo de rata inmunoestimulada con uña de gato.



Anexo 9. Muestra de médula ósea de rata.



Anexo 10. Muestra de médula ósea de rata inmunodeprimida.



Anexo 11. Muestra de médula ósea de rata inmunestimulada con uña de gato.

