



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E. A. P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA *in vitro* DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO
DE *Niphidium crassifolium* “calaguala” SOBRE CÉLULAS DEL
SISTEMA INMUNE**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. PORTAL HUACCHA MARÍA ELVIRA

ASESOR:

Dr. Blgo. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

CO - ASESORA:

Dra. Q.F. JÉSSICA NATHALIE BARDALES VALDIVIA

CAJAMARCA – PERÚ

2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Ciudad Universitaria -1Q -115- Av. Atahualpa N° 1050-Cajamarca -

☎ 076-599227 anexo 1272



La Directora de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Cajamarca, Doctora Martha Vicenta Abanto Villar que suscribe, deja

CONSTANCIA

Que, la tesis titulada **ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA *in vitro* DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Niphidium crassifolium* "calaguala" SOBRE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE**, presentada por la Bachiller en Ciencias Biológicas **MARÍA ELVIRA PORTAL HUACCHA**, ha sido revisada en el Software Antiplagio **TURNITIN** de la Universidad Nacional de Cajamarca, obteniendo un puntaje de 20% de similitud, considerado dentro de los parámetros requeridos. Teniendo como Asesor al Docente **Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto**, Co- Asesora **Dra. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia**.

Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que considere convenientes.

Cajamarca, 29 de febrero del 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

Dra. Martha Vicenta Abanto Villar
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN (c)

COPYRIGHT©

MARÍA ELVIRA PORTAL HUACCHA

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Portal, M. 2023. **Actividad inmunomoduladora *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Niphidium crassifolium* “calaguala” sobre células del sistema inmune**/María Elvira Portal Huaccha.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Blgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-Asesora: Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo –

UNC 2024

**ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA *in vitro* DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Niphidium
crassifolium* “calaguala” SOBRE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE**

AUTORA: Bach. María Elvira Portal Huaccha

ASESOR: Dr. Blgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

CO-ASESORA: Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



Presidente
Dr. Luis García Izquierdo



Secretario
M.Cs. William Soriano Castillo



Vocal
Dra. Carmen Eddy Medina Rodríguez

Cajamarca, 2024-Perú



Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Av. Atahualpa 1050

Teléfono/ Fax 36-5845



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 15:00 del 23 de Febrero del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 11-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Actividad Inmunomoduladora In Vitro de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de Niphidium crassifolium "Calaguala" sobre células del sistema inmune del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Maria Elvira Portal Huaccha

Siendo las 15:50 del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: BUENO, con el calificativo de: 16, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTA para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (Dr. Luis García Izquierdo), Secretario(a) (Mcs. William Soriano Castillo), Vocal (Dra. Carmen Eddy Medina Rodriguez), Accesitaria (—), Asesor (a) (Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto), and Co Asesor (a) (Dra. R. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia).

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

MUY BUENO (17-18)

BUENO (14-16)

REGULAR (12-13)

REGULAR BAJO (11)

DESAPROBADO (10 a menos)

Observaciones: Explicar detalladamente los aspectos metodológicos de su trabajo de tesis. Revisar la redacción de todo su informe de tesis. Mejorar la discusión

A:

A mi abuelito Santiago Portal, gracias infinitas por tu cariño, tu apoyo y todos tus consejos que me siguen guiando.

A mi profesora Florinda Rojas Chancahuana, su orientación fue fundamental, gracias por su persistencia y su guía en el aspecto académico.

En la ciencia no hay un amplio camino
real y sólo puede alcanzar sus alturas
radiantes aquel que, sin temor al
cansancio, trepa por sus pedregosos
senderos.

Karl Marx

Agradecimiento

A mi asesor Dr. Marco Rivera Jacinto y mi co-asesora Dra. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia, quienes contribuyeron al alcance de cada objetivo en la ejecución del proyecto de investigación. Gracias por la paciencia y el gran apoyo brindado.

A mis padres y mis tres hermanos por el gran apoyo económico y moral.

A los investigadores del laboratorio de inmunología e investigación de la E.A.P. Medicina Veterinaria de la UNC, gracias por su apoyo incondicional.

A mis amigos de la E.A.P. Biología y Biotecnología que me apoyaron con sus consejos, sugerencias, su compañía durante el trabajo en laboratorio y los materiales brindados. De igual manera a los amigos que gustosamente aceptaron participar en este trabajo de tesis con la donación de las muestras.

Finalmente, a Dios por colocar personas maravillosas en mi entorno que me enseñaron el valor de la amistad y el compañerismo durante el desarrollo de este proyecto. Gracias Dios por esta trayectoria recorrida, por infundirme fuerzas y por este logro.

Tabla de contenido

TÍTULO	xv
Resumen.....	xvi
Abstract.....	xviii
CAPÍTULO I	20
INTRODUCCIÓN	20
CAPÍTULO II.....	23
MARCO TEÓRICO	23
2.1. Antecedentes de la investigación	23
2.2. Bases teóricas.....	27
2.2.1. <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger	27
2.2.2. Sistema inmune.....	34
2.2.3. Células del sistema inmune.....	35
2.2.4. Granulocitos.....	35
2.2.5. Linfocitos	37
2.2.6. Linfocitos y su proliferación <i>in vitro</i>	38
2.2.7. Leucocitos Polimorfonucleares.....	40
2.2.8. Macrófagos	40
2.2.9. Fagocitosis	41
2.2.10. Sistema del complemento	44
2.2.11. Inmunomodulación	48
2.2.12. Los inmunofármacos.....	50
2.2.13. Plantas que modulan la respuesta inmune.....	51
CAPÍTULO III.....	54
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	54
3.1. Nivel de la Investigación.....	54
3.2. Tipo y diseño de estudio	54
3.3. Material biológico	54
3.4. Colección del material biológico	54
3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	55
3.5.1. Tratamiento de material biológico.....	55
3.5.2. Obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger.....	55

3.5.3. Determinación cualitativa de los principales compuestos bioactivos presentes en <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger	56
3.5.4. Preparación de diluciones del extracto hidroalcohólico de <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger	58
3.5.5. Determinación de la capacidad inmunomoduladora sobre la proliferación linfocitaria del extracto hidroalcohólico de <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger	58
3.5.6. Determinación del efecto inmunomodulador del extracto de <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger sobre la fagocitosis polimorfonuclear	64
3.5.7. Ensayo hemolítico para la valoración de la actividad del sistema de complemento mediante la vía clásica	66
CAPÍTULO IV	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
4.1. Resultados	70
4.1.1. Determinación cualitativa de los principales compuestos bioactivos presentes en <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger	70
4.1.2. Capacidad inmunomoduladora de la proliferación linfocitaria del extracto hidroalcohólico de <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger	70
4.1.3. Efecto inmunomodulador del extracto de <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger sobre la fagocitosis polimorfonuclear	73
4.1.4. Valoración de la actividad del sistema de complemento mediante el ensayo hemolítico	75
4.2. Discusión.....	77
CAPÍTULO V.....	85
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
5.1. Conclusiones	85
5.2. Recomendaciones.....	86
LISTA DE REFERENCIAS	87
APÉNDICES	96
Apéndice 1. Vista panorámica de la zona de muestreo del material vegetal.....	96
Apéndice 2. Plantas de <i>Niphidium crassifolium</i> (L.) Lellinger (calaguala).....	96
Apéndice 3. Procesamiento de muestras de rizomas y frondas de calaguala para obtención del extracto hidroalcohólico.....	97
Apéndice 4. Diferentes pruebas cualitativas que determinaron la presencia y ausencia de metabolitos bioactivos en los extractos de frondas y rizomas de calaguala.	98
Apéndice 5. Proceso de obtención de células mononucleares de sangre periférica y proliferación celular de linfocitos.	99

Apéndice 6. Observación microscópica (100X) de neutrófilos humanos haciendo fagocitosis de <i>C. albicans</i> , las células fagocitadas se observan de un color morado diferente al color de los núcleos de neutrófilos, algunas levaduras con un halo transparente.....	100
Apéndice 7. Visualización de la hemólisis de eritrocitos de carnero luego del tratamiento con los extractos de calaguala, sedimentación de eritrocitos no lisados (A).....	101
Apéndice 8. Consentimiento informado para participación de seres humanos en el estudio de investigación, formato correspondiente al nivel de riesgo mínimo.	102

Lista de abreviaciones

RPMI: Roswell Park Memorial Institute, medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión.

PMN: células polimorfonucleares.

PHA: fitohemaglutinina.

SHEa: eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos de conejo anti eritrocitos de carnero.

RBC: células rojas sanguíneas.

Glosario

Efecto inmunomodulador: es el efecto regulador o modulador de la inmunidad, el cual se logra a través de la reducción o potenciación de la respuesta inmune (1).

Extracto hidroalcohólico: se dice del extracto en sólido que se ha obtenido mediante la extracción de los principios activos de una droga con agua más alcohol y su posterior evaporación del solvente (2).

Eritrocitos sensibilizados: son eritrocitos de carnero que han sido sensibilizados con anticuerpos de conejo anti-estroma de eritrocitos de carnero, los mismos que dan inicio a la activación de la cascada del complemento de la vía clásica en el suero o plasma (3).

Mitógeno Fitohemaglutinina: son proteínas liofilizadas y altamente refinadas provenientes de semillas de *Phaseolus* spp., las mismas que tienen actividad mitogénica mediante la unión a oligosacáridos para estimular la división celular de linfocitos (4).

Linfoproliferación *in vitro*: proliferación de linfocitos aislados de sangre periférica humana en medio de cultivo RPMI y en condiciones estándar de incubación (5).

**ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA *in vitro* DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
Niphidium crassifolium “calaguala” SOBRE CÉLULAS DEL SISTEMA
INMUNE**

Resumen

Las propiedades inmunomoduladoras de las plantas medicinales están siendo estudiadas con mayor interés debido a la creciente necesidad de modular el sistema inmunológico, para lograr efectos de prevención de infecciones, tratamiento del cáncer y enfermedades autoinmunes. En este estudio se determinó la actividad inmunomoduladora del extracto hidroalcohólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lessinger “calaguala” sobre células del sistema inmune; para lo cual, se evaluó la proliferación de linfocitos cultivados en medio RPMI 1640 más fitohemaglutinina (PHA) en presencia de cinco concentraciones de extractos de frondas y rizomas. Se evaluó la inmunomodulación de la fagocitosis en neutrófilos, al enfrentar estas células con *C. albicans* en presencia de los extractos, donde se determinó el porcentaje de neutrófilos fagocíticos y el número total de levaduras fagocitadas. También se evaluó la inmunomodulación de la actividad del sistema del complemento vía clásica, mediante la determinación de la hemoglobina liberada producto de la lisis de eritrocitos por la actividad del complemento al enfrentar eritrocitos sensibilizados, suero humano y los extractos correspondientes a los tratamientos. De esta manera, este estudio demostró que el extracto hidroalcohólico de *N. crassifolium* tiene actividad inmunomoduladora. El extracto de rizomas inhibió la proliferación de linfocitos en las concentraciones de 1000 µg/mL y de 500 µg/mL ($p < 0,000$). Los extractos hidroalcohólicos de frondas y rizomas incrementaron la capacidad de fagocitosis de los neutrófilos en concentraciones menores a 125 µg/mL ($p < 0,05$; $p < 0,005$). Con respecto a la actividad del sistema del complemento, el extracto de frondas a 500 µg/mL ocasionó mayor hemólisis en comparación al control negativo ($p < 0,05$). Por lo que, *N. crassifolium* es una planta que se constituye como una alternativa para la adquisición de metabolitos con acción inmunomoduladora.

Palabras clave: Inmunomodulación, Extracto de *Niphidium Crassifolium* (L.) Lellinger, Proliferación Celular, Fagocitosis, Ensayo de Actividad Hemolítica de Complemento.

Abstract

The immunomodulatory properties of medicinal plants are being studied with greater interest due to the growing need to modulate the immune system, to achieve infection prevention, cancer treatment and autoimmune diseases effects. In this study, the immunomodulatory activity of the hydroalcoholic extract of *Niphidium crassifolium* (L.) Lessinger “calaguala” on cells of the immune system was determined; for which, the proliferation of lymphocytes cultured in RPMI 1640 medium plus phytohemagglutinin (PHA) was evaluated in the presence of five concentrations of frond and rhizome extracts. The immunomodulation of phagocytosis in neutrophils was evaluated by confronting these cells with *C. albicans* in the presence of the extracts, where the percentage of phagocytic neutrophils and the total number of phagocytosed yeasts were determined. The immunomodulation of the activity of the complement system was also evaluated through the classical route, by determining the hemoglobin released as a result of the lysis of erythrocytes by the activity of the complement when confronted with sensitized erythrocytes, human serum and the extracts corresponding to the treatments. Thus, this study demonstrated that the hydroalcoholic extract of *N. crassifolium* has immunomodulatory activity. The rhizome extract inhibited lymphocyte proliferation at concentrations of 1000 µg/mL and 500 µg/mL ($p < 0.000$). Hydroalcoholic extracts of fronds and rhizomes increased the phagocytosis capacity of neutrophils at concentrations lower than 125 µg/mL ($p < 0.05$; $p < 0.005$). Regarding the activity of the complement system, the frond extract at 500 µg/mL caused greater hemolysis compared to the negative control ($p < 0.05$). Therefore, *N. crassifolium* is a plant that is constituted as an alternative for the acquisition of metabolites with immunomodulatory action.

Keywords: Immunomodulation, *Niphidium Crassifolium* (L.) Lellinger Extract, Cellular Proliferation, Phagocytosis, Complement Hemolytic Activity Assay

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las plantas son un insumo fundamental en la medicina tradicional en todo el mundo, miles de ellas se utilizan para tratar enfermedades; sin embargo, muchas de ellas no cuentan con una investigación calificada previa y son utilizadas solo por su efecto benéfico conocido comúnmente entre los miembros de las comunidades campesinas y nativas. Perú como país megadiverso no es ajeno a esto, en distintas regiones hay muchas especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional; sin embargo, hay pocos estudios realizados en la mayoría de estas plantas (6).

Niphidium crassifolium (L.) Lellinger (calaguala) es una planta medicinal que crece en los valles interandinos de la sierra norte de Perú y ampliamente utilizada en la medicina tradicional, en forma de compresas y decoctos de las hojas y rizomas para tratar hematomas, bronquios inflamados, gastritis, artritis, enfermedades renales, hipertensión, tumores cancerígenos, psoriasis, vitíligo, e incluso como cicatrizante, entre otros. Hay investigaciones que afirman que las plantas con estos usos en la medicina tradicional tienen la capacidad de modular la respuesta inmunológica (7,8).

La industria cosmética y farmacéutica utiliza metabolitos vegetales para el diseño de nuevos productos y fármacos que posteriormente se producen de manera sintética. Debido a la fuerte demanda de productos naturales y amigables con el medio ambiente, la búsqueda de nuevos metabolitos ha ido recobrando mucha importancia, de tal forma que, estudios exhaustivos en diversas plantas han dado origen al descubrimiento de moléculas que se han convertido en el punto de partida en la obtención de nuevos fármacos, entre ellos los inmunomoduladores, útiles para combatir enfermedades crónicas. La demanda

en el caso de enfermedades crónicas, apunta a fármacos biológicos altamente específicos como citoquinas, anticuerpos, antitoxinas, entre otros; sin embargo, los medicamentos de molécula pequeña provenientes de plantas tienen mayor estabilidad en su suministro vía oral, son componentes multivalentes, controlan vías de señalización celular y tienen menos efectos secundarios. Algunos fármacos de origen vegetal conocidos son la digoxina, quinina, artemisinina, morfina, paclitaxel, aspirina, entre otros (9–11).

Se han encontrado diversas plantas cuyos extractos, decoctos o aceites modulan la respuesta inmune. Plantas como *Chenopodium quinoa* Willd (quinua), *Chuquiraga spinosa* Less (huamanpinta), *Croton lechleri* Müll.Arg (sangre de grado), *Lepidium meyenii* Walp (maca), *Mauritia flexuosa* Lf (aguaje), *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi), *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Uncaria tomentosa* DC. (uña de gato), *Equinacea purpurea* L. Moench, *Panax ginseng* C.A. Meyer, entre otros, han demostrado tener gran potencial terapéutico y sus principios activos son polisacáridos, terpenoides, flavonoides, alcaloides, glucósidos y lactonas; siendo estos metabolitos los responsables de la inmunomodulación sobre células del sistema inmune con un potencial en la prevención y cura de muchas enfermedades. Los metabolitos inmunomoduladores ayudan a regular el sistema inmune mediante su efecto inmunopotenciador, inmunosupresor o inmunoadyuvante (12–14).

El sistema inmune está conformado por una red compleja de células, anticuerpos, moléculas, tejidos y sustancias solubles que en conjunto ayudan a mantener el equilibrio fisiológico interno saludable de los seres humanos al reconocer y actuar de manera rápida ante agentes patógenos extraños. El término inmunomodulación significa modificar la respuesta inmune mediante un agente que suprime o activa la respuesta inmune, estos agentes pueden ser moléculas de origen sintético o biológico (10).

Bajo este contexto, planteamos investigar algunas propiedades vinculadas con la actividad inmunomoduladora de una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional Cajamarquina, *N. crassifolium* (calaguala), a fin de generar evidencia científica de estas propiedades y generar las bases para el estudio y la adquisición de metabolitos inmunomoduladores de sus rizomas y frondas. En este trabajo se evaluó las propiedades de la “calaguala” midiendo la proliferación celular de linfocitos, la fagocitosis *in vitro* y la actividad del complemento en presencia del extracto hidroalcohólico de la planta.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Alvarenga *et al.* (2018), estudiaron la actividad inmunomoduladora de plantas del género *Baccharis*, entre ellas *B. trimera*, *B. punctulata* y *B. notoserghila*, de las cuales obtuvieron extractos concentrados y extractos crudos. Aislaron células mononucleares de sangre periférica y evaluaron el efecto inmunomodulador mediante ensayos de proliferación celular con extractos a las concentraciones de 5, 10, 25 y 50 µg/mL. Las concentraciones de 5 y 10 µg/mL de extractos metanólicos de *B. trimera* y *B. punctulata* mostraron efecto inmunomodulador de la proliferación celular con incremento en el número de células. De igual manera, *B. notoserghila* mostró efecto inmunomodulador en todas las concentraciones del extracto metanólico, a excepción de la concentración 50 µg/mL que mostró un efecto tóxico. Los investigadores concluyen que las especies estudiadas presentan actividad inmunomoduladora sobre células mononucleares humanas y se constituyen como plantas con gran potencial en la obtención de compuestos bioactivos con actividad sobre el sistema inmune (5).

Haria *et al.* (2016), evaluaron los efectos inmunomoduladores sobre células mononucleares (PBMC) en presencia de tinturas de etanol de *Echinacea laevigata* proveniente de tallo, hojas, raíz y flores de la planta; de las cuales se extrajeron los metabolitos con una mezcla de etanol y agua, la composición química del extracto se determinó mediante HPLC, demostrando así que el extracto proveniente de flores tiene la mayor cantidad de compuestos bioactivos, predominando el ácido caféico el cual sería el responsable del efecto

inmunomodulador. Las células se incubaron por 74 h antes de evaluar su proliferación utilizando el método de sal de tetrazolio; además, también se evaluaron dos parámetros inmunológicos (TNF e IL-10), encontrando que extractos de raíces de la planta tenían fuerte actividad inmunomoduladora sobre tres parámetros inmunológicos (15).

Bhanwase y Alagawadi evaluaron la actividad inmunomoduladora y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Ficus benghalensis* Linn y sus cuatro fracciones (cloroformo, hexano, butanol y agua); para lo cual obtuvieron hojas de la planta que pulverizaron y maceraron con etanol al 50 % por 7 días con agitación ocasional. Para determinar la actividad inmunomoduladora *in vitro* del extracto realizaron la prueba de fagocitosis con células inactivas de *Candida albicans*, la prueba de actividad candidacida y la prueba de detección con nitroazul tetrazolio (NBT). Las concentraciones utilizadas del extracto en este estudio fueron 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL y 62,5 µg/mL. Los investigadores determinaron que el extracto hidroalcohólico de *F. benghalensis* y sus cuatro fracciones estimularon la fagocitosis de *C. albicans*, en un promedio de 5 células fagocitadas a la mayor concentración del extracto. Además, determinaron que el extracto tuvo 29 % de actividad candidacida en la concentración 1000 µL/mL, llegando a la conclusión que el extracto hidroalcohólico y sus fracciones tienen actividad inmunomoduladora positiva (16).

Magaji *et al.* (2020), investigaron la actividad inmunomoduladora del extracto acuoso de hojas de *Cassia occidentalis* en neutrófilos humanos. Recolectaron hojas frescas de la planta, lavaron, secaron y pulverizaron; utilizaron 1300 g de polvo/L de agua destilada a 40°C para elaborar el extracto acuoso. Los neutrófilos

fueron aislados de sangre periférica mediante la técnica de centrifugación en gradiente usando Histopaque. En tubos Falcon se mezclaron los extractos de cada concentración (25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL y 1000 µg/mL) con la suspensión de neutrófilos (2×10^6 células/mL) y la suspensión de levaduras (*C. albicans*, 2×10^6 células/mL); luego de la incubación por 30 min a 37 °C se fijaron en láminas porta objetos para realizar el recuento celular y determinar el índice fagocítico y el índice microbicida del extracto. Los investigadores determinaron que el mayor índice fagocítico fue de 80,2 % con 1000 µg/mL del extracto. Las diferencias entre los distintos tratamientos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,0001$), llegando a la conclusión que hubo incremento significativo en la inmunoestimulación de la fagocitosis en neutrófilos humanos con la mayor concentración del extracto (17).

Lemus (2007), evaluó la actividad inmunomoduladora de los extractos de seis plantas nativas de Guatemala, *Cissampelos tropaeolifolia*, *Justicia pectoralis*, *Lippia chiapasensis*, *Pimenta dioica*, *Piper auritum* y *Ternstroemia tepezapote*. Para realizar la evaluación sobre la vía clásica del complemento utilizó el ensayo hemolítico con eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos anti-eritrocitos de carnero, los mismos que se incubaron a 37 °C con los extractos, iniciando con 500 µg/mL y 5 diluciones sucesivas al 50 %. La hemólisis se determinó mediante medición de densidad óptica de las muestras en un lector de ELISA. Según los resultados la investigación demostró que los extractos de hojas de *T. tepezapote* y *L. chiapasensis* tienen actividad inhibitoria de la vía clásica del sistema del complemento, donde a mayor concentración hubo mayor porcentaje de inhibición (18).

Vargas (2022), evaluó el efecto antiinflamatorio y cicatrizante del extracto etanólico de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger “calaguala” recolectados a 3 052 m s.n.m. en Huaraz, departamento de Ancash. El extracto obtenido en forma de polvo se mezcló con una crema base hasta obtener las concentraciones de 5 %, 10 % y 20 %. Se irritó la piel de las orejas de 50 ratones de 3 meses de edad con 10 µL de xilol antes del tratamiento con la mezcla que contenía el extracto. Se determinó el porcentaje de inhibición de la inflamación a través de una fórmula utilizando el porcentaje de inflamación del grupo control y del grupo problema. La actividad cicatrizante incrementó proporcionalmente a la concentración del extracto de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger (“calaguala”). Además, se determinó la composición fitoquímica del extracto mediante cromatografía de capa fina, el cual demostró la presencia de flavonoides, taninos y quinonas; sin embargo, no se encontraron glicósidos, aminoácidos libres, carbonilos, saponinas ni alcaloides. El estudio concluye que el extracto etanólico de rizomas de calaguala presenta actividad cicatrizante, y que su efecto antiinflamatorio es independiente de la concentración (8).

Condori (2013), realizó un estudio experimental en ratas “Holtzman” con el objetivo de evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto seco de rizomas y en gel al 20 % de *Polypodium crassifolium* L. (calaguala), sobre el edema plantar de estos animales. Los resultados de la cromatografía indicaron presencia de flavonoides, saponinas, taninos y quinonas en el extracto etanólico. Luego del análisis estadístico concluye que el gel con extracto seco de *P. crassifolium* al 20 % tiene mayor efecto antiinflamatorio que el extracto puro (19).

2.2. Bases teóricas.

Las plantas constituyen el mejor reservorio de moléculas bioactivas utilizadas para tratar diversas enfermedades en la medicina tradicional (20). La comunidad científica busca nuevos fármacos de origen natural debido a que estos tienen características multivalentes, son de fácil acceso y ocasionan menores efectos secundarios (21,22). La resistencia a los antimicrobianos es una importante emergencia mundial que causa alrededor de 700 000 muertes cada año y se prevé que para el 2050 esta cifra ascenderá a 10 millones, del mismo modo, distintas formas de cáncer y otras enfermedades podrían incrementar estas cifras. Frente a esta problemática, fortalecer el sistema inmunológico es un punto clave para contrarrestar las posibles cifras (22,23). Así, la comunidad científica de la medicina moderna se ha vinculado con la medicina tradicional para buscar y elaborar nuevos fármacos con alto potencial terapéutico, la inmunoterapia con el uso de fitoquímicos de origen vegetal en la actualidad se encuentra ganando terreno para contrarrestar los efectos de una amplia gama de enfermedades (22). Asimismo, con la finalidad de encontrar nuevas plantas con propiedades de alto potencial farmacéutico se ha estudiado la propiedad inmunomoduladora de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger., helecho rizomatoso utilizado en la medicina tradicional cajamarquina.

2.2.1. *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger

2.2.1.1. Clasificación sistemática

De acuerdo a la clasificación del Herbario de Plantas Ornamentales Carlos Contreras Pagés (HEFA), esta planta epífita perteneciente al reino Plantae, división Tracheophyta, clase Polypodiopsida,

orden Polypodiales, familia Polypodiaceae, género *Niphidium* y especie *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger (24).

2.2.1.2. Sinónimos

Sinónimos homotípicos (25)

- *Campyloneurum crassifolium* (L.) Christenh.
- *Polypodium crassifolium* L.

Sinónimos heterotípicos (25)

- *Dipteris crassifolia* J.Sm.
- *Phymatodes acrosora* (Kunze) C.Presl
- *Phymatodes crassifolia* C.Presl
- *Phymatodes porrecta* C.Presl
- *Anaxetum crassifolium* Schott
- *Drynaria crassifolia* J.Sm.
- *Pessopteris crassifolia* Underw. & Maxon
- *Pessopteris crassifolia* var. *angusta* farw.
- *Pleopeltis crassifolia* T. Moore
- *Pleuridium angustum* Fée
- *Pleuridium crassifolium* Fée
- *Polypodium acrosorum* Kunze
- *Polipodio brasiliense* f. *giganteum* Domin
- *Polypodium coriaceum* Raddi
- *Polypodium giganteum* Desv.
- *Polypodium porrectum* Willd.
- *Serpocaulon giganteum* (Desv.) ARSm.

2.2.1.3. Nombre común

En la actualidad esta planta también es conocida por sus diferentes nombres comunes: calaguala, calawala, calahuala, lengua de ciervo, hierba del lagarto, polipodio, entre otros. Sin embargo, estos nombres también son empleados para una amplia variedad de helechos, aun cuando no pertenecen a la misma familia Polypodiaceae (7).

2.2.1.4. Descripción botánica

Niphidium crassifolium (L.) Lellinger es considerada una planta herbácea rizomatosa perenne, sus frondas miden desde 80 cm hasta 1 m de alto. Tiene un pecíolo corto, achatado, glabro, pajizo; sus hojas tienen lamina simple, coriácea, lanceolada, elíptica lanceolada u oblanceolada; su venación es penninervada entre las que se encuentran soros marrones circulares y alineados formando una sola serie entre dos nervaduras laterales (7).



Figura 1. *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger.

2.2.1.5. Distribución geográfica

Perú posee 38 climas de los cuales 15 se encuentran en el departamento de Cajamarca, en la región norandina del Perú (26), por lo que se han desarrollado zonas propicias para el crecimiento de diversas plantas medicinales que ofrecen grandes posibilidades de aprovechamiento sostenible, entre ellas se encuentra *N. crassifolium* (L.) Lellinger, helecho epífito con rizoma rastrero que crece en zonas semi soleadas y en suelos húmedos, sobre árboles y rocas, en el interior de los bosques serranos de la región quechua y específicamente en la ladera media de Cajamarca entre 2500 a 3000 m.s.n.m. (7).

En Cajamarca *N. crassifolium* (L.) Lellinger crece en Chetilla, Luchopucro Bajo, Otuzco, Agomarca, entre otros; con temperatura promedio de 17 °C y bajo precipitación de 700 mm anual. Se asume que estas son las condiciones físicas adecuadas para su crecimiento de *N. crassifolium* (L.) Lellinger en Cajamarca; donde su máximo desarrollo se observa en época de lluvia; sin embargo, en época de sequía, su crecimiento se da en menor proporción y con formación de clorosis. Estas plantas absorben nutrientes de otros vegetales y resisten más a las sequías de ser plantas epífitas (7).

Este vegetal es relevante por sus usos terapéuticos tradicionales. Los pobladores cajamarquinos utilizan especies de plantas curativas desde tiempos inmemorables, pasando este conocimiento tradicional (modo de uso, propiedades, morfología y técnicas de

manejo) de generación en generación dándoles un importante valor cultural y social. En la región Cajamarca, *N. crassifolium* se utiliza tradicionalmente como compresas y decoctos de rizomas para tratar gastritis, estreñimiento, hipertensión, inflamación renal, inflamación hepática, heridas y hematomas (7).

Existen pocos estudios científicos en cuanto al efecto inmunomodulador de *N. crassifolium* (L.) Lellinger, pero se han realizado experimentos celulares *in vitro* e *in vivo* con *Polypodium leucotomos*, helecho perteneciente a la misma familia Polipodiaceae, que ha mostrado efectos antioxidantes, antiinflamatorios e inmunomoduladores. Los principios activos de este vegetal, reducen la cantidad de células dañadas por el sol, eliminan radicales y protegen el ADN (27).

Estudios demuestran que el extracto de *P. leucotomos*, ayuda a prevenir el envejecimiento cutáneo y disminuye el riesgo de padecer cáncer ligado a las radiaciones ultravioletas, cura la dermatitis atópica y la erupción polimórfica leve; además, inhibe la acción de las citocinas y el decocto del rizoma produce efecto diurético moderado en ratas. Por experimentos *in vitro*, se determinó el efecto inmunosupresor del extracto de *Polypodium decumanum*; y se ha señalado la probabilidad de que la adenosina sea el componente bioactivo. Así mismo, en un estudio realizado en Perú, se encontró que el extracto seco de rizomas de *P. crassifolium* a una concentración de 20 % inhibe de manera significativa la inflamación plantar en ratones (19,28,29).

La fracción hidrofílica del extracto de frondas silvestres de *Polypodium leucotomos* conformado por azúcares como glucosa y fructosa, compuestos fenólicos antioxidantes, ácido químico y málico ha demostrado una actividad inmunosupresora en la proliferación de linfocitos T de ratones cultivados *in vitro* con el mitógeno concavalina A (Con A), la misma que se correspondió con la inhibición de la producción *in vitro* de interleucina 2 (IL-2) en dichos linfocitos (30).

El extracto a base de *Polypodium leucotomos* que contiene una saponina denominada calagualina quien inhibe la secreción de IL-2 en linfocitos T; induce la producción de IL-1 alfa, IL-1 beta, factor de necrosis tumoral alfa y citocinas independientemente de la presencia de concavalina A. Se ha evidenciado que la calagualina ejerce un efecto inmunomodulador sobre las fracciones de leucocitos humanos (31).

Algunas especies de calaguala, específicamente *Niphidium albopunctatissimum* Lellinger, *Polypodium triseriale*, *Polypodium picnocarpum* y *P. leucotomos* tienen diversos componentes fitoquímicos que funcionan como principios activos; en sus rizomas y frondas se encuentran azúcares reductores, aceites esenciales, nitrato de potasio, glicorrizina (ácido glicoretínico), mucílago, almidón, polipodina, aceites grasos, saponinas, taninos, esteroides, resinas, ácido caféico, ferúlico, clorogénico, antocianinas, polifenoles, alcaloides, naftoquinonas, glicósidos, flavonoides como: rutina, hyperósido, quercitrina y ácido

clorogénico; adenosina como uno de los principios activos inmunomoduladores y calagualina con actividad antitumoral (32–34).

Los terpenoides, los compuestos fenólicos y los alcaloides son compuestos de bajo peso molecular y principalmente inmunomoduladores. Los fitoquímicos activan genes no codificantes para activar otros que sí se expresan, activan o suprimen diferentes miRNAs para contrarrestar el efecto de algún miRNA oncogénico activado o para restaurar el nivel de expresión normal en el caso o los miRNAs con función supresora de tumores (35). El potencial de los constituyentes fitoquímicos como moduladores de distintos eventos epigenéticos en la salud humana se ha hecho evidente. Los fitoquímicos y otros compuestos bioactivos restauran patrones de metilación del ADN del promotor global y específico del gen reactivando las metiltransferasas del ADN o proporcionando la provisión de grupos metilo. Varios productos naturales, como epigallocatequina-3-galato, curcumina, sulforafano, han mostrado actividad inhibitoria de la ADN metiltransferasa, pero esta propiedad necesita investigaciones más profundas. En algunos casos estos fitoconstituyentes inducen una reducción de citoquinas proinflamatorias y una mayor concentración de citoquinas antiinflamatorias con efecto protector y modulador sobre la respuesta inmune (36–38).

2.2.2. Sistema inmune

El sistema inmunitario es una red integrada de células, moléculas, órganos y vías muy interconectadas, que protegen de manera conjunta el organismo humano contra los agentes patógenos, originando así la respuesta defensiva ante la presencia de diversos agentes, desde los más pequeños como los virus intracelulares hasta los más grandes como los parásitos. La respuesta inmune se divide en inmunidad innata y adaptativa, la primera es la más antigua filogenéticamente y genera una respuesta más rápida; sin embargo, no es específica ni adquiere memoria, siendo esto característico de la inmunidad adaptativa (39,40).

La respuesta adaptativa tiene cuatro etapas bien definidas, la primera comprende el reconocimiento del antígeno por los linfocitos a través de sus receptores específicos, y empieza la segunda etapa que incluye la proliferación linfocítica donde los linfocitos sensibilizados van hasta el ganglio linfático más cercano para estimular a los linfocitos latentes, aumentando la proliferación y su posterior diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos (40).

En la tercera etapa se da la respuesta en sí, los linfocitos se valen de mecanismos humorales y celulares para actuar, mediante la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno presente y la destrucción del patógeno o la inactivación del mismo mediante células estimuladas por linfocitos. Finalmente, el acoplamiento de anticuerpos y linfocitos para la destrucción del patógeno o la neutralización de la toxina es conocida como la cuarta etapa (40).

Algunos fitoquímicos como alcaloides, compuestos fenólicos, carotenoides, compuestos nitrogenados y órganosulfurados desencadenan respuesta inmune de manera positiva e intervienen en procesos inflamatorios (41).

2.2.3. Células del sistema inmune

El sistema inmune está conformado por dos tipos de respuestas, innata y adaptativa; donde los principales efectores son las células que lo conforman. Estas células provienen de células madres adultas (SHC) de la médula ósea, de ahí migran a otros órganos donde se diferencian y se activan para cumplir con una función específica en el cuerpo humano (42). Las células madre tienen dos capacidades, la autorrenovación y la diferenciación en diversos tipos de células. Las primeras dan lugar a los progenitores mieloide – eritroide que va dar origen a los eritrocitos, granulocitos, eosinófilos, basófilos; y los progenitores linfoides que va dar origen a linfocitos T y B, además de las células natural killer (NK). Las células mieloides y las NK forman parte de la inmunidad innata y las células linfoides de la inmunidad adaptativa que generan respuesta inmunitaria específica y adquieren memoria. Las células de origen mieloide son las primeras en responder ante un agente extraño y son las que comunican a las células de origen linfoide, de esta manera trabajan en conjunto (42,43).

2.2.4. Granulocitos

Estas células tienen núcleo multilobulado y en su citoplasma contiene gránulos de proteínas que en una coloración les distinguen del resto de

células. Son leucocitos clasificados en neutrófilos, basófilos, mastocitos y eosinófilos debido a las diferencias muy peculiares que tienen cada uno (42).

Los Neutrófilos son células que constituyen del 50 al 70 % de los leucocitos en la sangre, son los componentes celulares más abundantes del sistema inmune innato, llamados también leucocitos polimorfonucleares (PMN). Luego de diferenciarse en la médula ósea migran al torrente sanguíneo en donde circulan por algunas horas, luego son trasladadas a los tejidos, una vez ahí también tienen la función de fagocitosis (42). Con 10 a 20 μm de diámetro y un núcleo que forma 2 a 5 lóbulos interconectados, estas células maduras tienen el promedio de vida más corta en comparación con el resto de leucocitos, 8 – 20 h en circulación. El incremento de estas células en sangre se conoce como leucocitosis e indica la presencia de una infección en términos médicos; son células altamente inflamatorias, ya que son las primeras en reclutarse en los sitios de infecciones, formando así la primera línea de defensa ante la presencia de agentes extraños en el organismo (42–44).

Estas células además de su función fagocítica también eliminan patógenos mediante la liberación de estructuras extracelulares denominadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET), estas estructuras están conformadas por ADN y proteínas con función antimicrobiana (44). Son células que contienen gránulos primarios y secundarios en su citoplasma con función destructiva de patógenos, estos gránulos son lisosomas con hidrolasas ácidas, mieloperoxidasa, muramidasa, lactoferrina, lisozima, colagenasa, fosfatasa alcalina. También contienen proteínas tipo defensinas,

seprocidinas, catelicidinas y proteína inductora de la permeabilidad bacteriana (BPI) (45).

Tabla 1. Concentración y frecuencia de células en la sangre del ser humano (46).

Tipo de célula	Célula/mm ³	Leucocitos totales %
Eritrocitos	5,0 x 10 ⁶	
Plaqueta	2,5 x 10 ⁵	
Leucocitos	7,3 x 10 ³	
- Neutrófilos	3,7 – 5,1 x 10 ³	50 -70
- Linfocitos	1,5 – 3.0 x 10 ³	20 – 40
- Monocitos	1,0 – 4,4 x 10 ²	1 – 6
- Eosinófilos	1,0 – 2,2 x 10 ²	1 – 3
- Basófilos	< 1,3 x 10 ²	< 1

2.2.5. Linfocitos

Los linfocitos T, denominados así debido a su maduración en el Timo, tienen una molécula en su membrana llamada receptor de linfocito T; este receptor solo reconoce antígenos que vayan unidos a moléculas del tipo I y/o II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que se encargan del proceso de presentación de antígenos. Cuando se realiza el reconocimiento de antígenos ligado a MHC, los linfocitos T proliferan y se diferencian en efectores y de memoria (42,47).

Hay dos subpoblaciones bastante definidas, células T colaboradores (TH) y células T citotóxicas (TC), y una sub población nueva de células T reguladoras (TReg) (47). Las glucoproteínas de membrana CD4 y CD8 ayudan a diferenciar las células T colaboradores de las citotóxicas, respectivamente, en la sangre periférica humana normal la proporción es de 2:1. Cuando las células TH se activan, mediante la interacción con complejos antígeno – MCH adecuado, se convierten en células efectoras

que ayudan en la activación de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos y macrófagos. Por otro lado, la interacción con otros complejos desencadena proliferación y diferenciación en células efectoras del tipo linfocitos T citotóxicos (CTL), las cuales se encargan de vigilar las células del cuerpo humano eliminando aquellas que estén infectadas con cuerpos extraños en complejo con MCH del tipo I, como en el caso de infecciones virales, células de injerto de un tejido ajeno y células tumorales. Por otro lado, las TReg se distinguen por tener en su membrana CD4 y CD25, pero a diferencia de los TH, estas suprimen las inmunorreacciones. Tanto TH, TC y Treg de manera alternativa se diferencian en células de memoria (42,48).

2.2.6. Linfocitos y su proliferación *in vitro*

Los linfocitos se originan y maduran en la médula para luego ubicarse en los ganglios linfáticos donde se activan en presencia de un antígeno, y proliferan al interactuar con el complejo MCH *in vivo*; sin embargo, este tipo de células también tienen la capacidad de proliferar *in vitro* al interactuar con un mitógeno, entre los más reconocidos están la fitohemaglutinina (PHA) y la concavalina (Con A), lectinas que se encuentran en algunas plantas. Todo bajo el principio donde el metabolismo y la morfología de las células T cambian luego de ser estimuladas por antígenos o mitógenos *in vitro*, lo cual desencadena aumento de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, una serie de reacciones de proliferación y transformación a linfoblastos (49).

La mayoría de los linfocitos T circulantes en la sangre están en estado G₀. Para iniciar la activación de estas células, el receptor de células T (TCR)

presente en la superficie de los linfocitos reconoce e interactúa con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) cargado de péptidos en las células presentadoras de antígenos (APC) (49).

Las lectinas tienen la capacidad de activar linfocitos a través de la unión con las TCR de manera independiente de un antígeno, estos mitógenos inducen una cascada de señalización que activa moléculas específicas como p38 MAPK o conduce a activar una familia de factores de transcripción, como la vía de los transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT). Así la unión de la lectina fitohemaglutinina (PHA) con el TCR del linfocito en la superficie celular es similar a la unión con sus ligandos de superficie APC (49). Luego, mediante autofosforilación de los dominios y la posterior fosforilación de fosfoproteínas de tirosina, diversas reacciones terminan en la formación del complejo p36/p38-GRB2-SOS activando RAS, posteriormente se siguen activando varias reacciones de fosforilación en cascada realizadas en la vía MAPK, esta vía llega al núcleo donde activa al factor nuclear de células T activadas (NFAT), activando la transcripción de los genes de IL-2 e IL-2R. Luego de la unión de IL-2 a IL-2R, se fosforila la molécula Shc y se asocia con la molécula adaptadora GRB2, se une a SOS y conduce a la activación de la familia de genes RAS. Con la activación de RAS se producen una serie de eventos, aún no bien comprendidos, que permiten el crecimiento y proliferación celular de linfocitos T (49).

Los linfocitos tienen la capacidad de unirse a eritrocitos de carnero *in vitro* para formar agrupaciones llamadas rosetas E, esto debido a que los linfocitos T poseen un receptor de membrana CD2 quien es la mediadora

de la unión mediante la interacción con una glicoproteína LFA-3 (*leukocyte function antigen*) o CD58 que están presentes en algunas células, y los eritrocitos de carnero presentan un análogo de esta glicoproteína en su superficie (50).

2.2.7. Leucocitos Polimorfonucleares

Los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos forman parte de los leucocitos polimorfonucleares. Un leucocito polimorfonuclear (PMN) es un tipo de glóbulo blanco también llamado granulocito (40,51). Son los leucocitos que abundan más en la sangre periférica de individuos adultos, con un rango normal estándar de $2,0 - 7,0 \times 10^9$ células/mL. Tienen la capacidad de fagocitar y destruir una amplia gama de gérmenes patógenos. Gran parte de la maquinaria molecular necesaria para cada una de las respuestas se almacena en sus gránulos citoplasmáticos o bien en la membrana plasmática (8).

2.2.8. Macrófagos

Los macrófagos son células con diámetro entre 25 a 50 μ m, con un núcleo grande y central, derivan de los monocitos, son ricos en lisosomas y están destinados a la fagocitosis, siendo esta su principal función. Secretan moléculas que desarrollan la respuesta inmunitaria específica, controlan la inflamación, eliminan el tejido muerto y asisten en el proceso de restauración. Los macrófagos inmaduros son llamados monocitos y los que han pasado por el proceso de maduración, en el tejido conectivo se llaman histiocitos; en el tejido hepáticos se conocen como células de Kupffer, en

el cerebro se conocen como células de la microglía y en los pulmones son los macrófagos alveolares (52).

2.2.9. Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso inmunológico que se da tras la aparición de un agente extraño en los tejidos, es ahí donde las membranas de las células fagocíticas son dirigidas por los filamentos del citoesqueleto para formar pseudópodos mediante los cuales van engullendo los agentes extraños, y a través de la liberación de los componentes de sus lisosomas van destruyendo al agente extraño en el interior de cada célula. Estas células son principalmente macrófagos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas (53).

Las células fagocíticas tienen en su superficie receptores como son los patrones moleculares asociados a agentes patógenos (PAMP) los cuales reconocen moléculas de las superficies de los agentes microbianos, como moléculas conservadas de la pared celular de hongos y bacterias (mananos, β glucanos, lipopolisacáridos, proteínas de superficie y peptidoglicanos), sean o no patógenos (42).

Los receptores en los seres humanos que desencadenan respuesta inmunitaria son:

a) Receptores de reconocimiento de patrones

Receptores de lectina tipo C (clr): Receptor de manosa, Dectina 1, CD91/calreticulina.

Receptores recolectores: SR-A, SR-B.

b) Receptores de opsonina

Receptor de dominio de colágeno: CD91/calreticulin.

Receptores de complemento: CR1, CR3, CR4, CR1g, C1qRp.

Receptores Fc de inmunoglobulina: Fc α R, Fc γ Rs.

La activación de la fagocitosis también puede ocurrir de manera indirecta a través de unión a proteínas solubles llamadas opsoninas por parte de los fagocitos. Estas opsoninas también se unen a componentes repetitivos conservados de la superficie de bacterias, hongos y virus; por lo cual también son llamadas proteínas de reconocimiento de patrones solubles (42).

Cuando estas proteínas se unen a la superficie de los microorganismos los fagocitos las reconocen mediante el receptor de superficie, de esta manera desencadenan la fagocitosis (42).

Los PMN tienen la capacidad de reconocer receptores de lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, DNA extraño, glicolípidos y fragmentos de pared celular. Los receptores a los cuales están asociados estos componentes se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR), de los que forman parte los receptores tipo Toll (TLR) (45).

En los neutrófilos se expresan tres de estos receptores; TLR-1 y TLR-2 que reconocen peptidoglicanos de bacterias Gram positivas, y TLR-4 que reconoce lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas. Cuando los neutrófilos reconocen a agentes extraños estas células desencadenan

diversos procesos químicos que logran la internalización de estos agentes extraños mediante el proceso llamado fagocitosis, una vez dentro destruyen a estos agentes a través de los componentes químicos dentro de los neutrófilos mediante sustancias reactivas de oxígeno (ROS), proteasas y proteínas antimicrobianas de los gránulos que se encuentran en el citoplasma. El proceso de destrucción no tiene una duración muy prolongada ya que los gránulos no son sintetizados de novo durante la infección, sino que; el neutrófilo se encarga de sintetizarlo durante su diferenciación y lo almacena hasta el momento de destruir a un agente extraño en el proceso de la fagocitosis. A la vez estos neutrófilos activados también tienen la capacidad de reclutar linfocitos, macrófagos y más neutrófilos mediante la síntesis y liberación de quimiocinas y citoquinas (45).

Cuando los neutrófilos logran eliminar a los patógenos, estos leucocitos mueren mediante apoptosis espontánea o constitutiva, gracias a este proceso se elimina el riesgo de diseminación de productos tóxicos generado a partir de la fagocitosis. Una vez realizada la apoptosis, estas células pueden ser reconocidas y eliminados por los macrófagos en el bazo y en la médula ósea, por las células Kupffer en el hígado (42).

Los metabolitos de plantas también tienen la capacidad de suprimir o potenciar la fagocitosis, así, extractos de *Tinospora crispa* (L.) y *Heliotropium sarmentosum* (Lam.), han mostrado la capacidad de modular la sobreexpresión de receptores de superficie celular MAC-1 y la vía de señalización AKT, lo cual conduce a una mayor actividad fagocítica de los

neutrófilos, en el estudio también identificaron al ácido cafeico como un metabolito del extracto acuoso que interviene en la fagocitosis (54).

Hay diversos extractos que han demostrado capacidad para incrementar o inhibir la fagocitosis, así, extractos de *Aloe vera* (L) moech demostraron un incremento de la fagocitosis mediante reducción de la disponibilidad del Ca⁺ intracelular, el extracto de *Echinacea purpurea* (L) moech mediante la estimulación de receptores C3b y fcγ, *Ipomoea batata* (L) lam mediante la estimulación de la fusión del fagolisosoma, *Ocimum tenuiflorum* L y *Tinospora cordifolia* (wild.) mediante estimulación de la actividad de las enzimas lisosomales y *Echium amoenum* fisch., *Grewia asiatica* L, *Saccharum officinarum* L. mediante el incremento de especies reactivas del oxígeno (55).

2.2.10. Sistema del complemento

El sistema del complemento es un componente fundamental tanto para la inmunidad innata como para la inmunidad adaptativa, se conforma por una cascada de más de 30 proteínas séricas que actúan buscando eliminar patógenos de la sangre y los tejidos. Estas proteínas se activan de manera secuencial unas con otras a través de tres vías de activación: vía de las lecitinas, vía clásica y vía alternativa (56). Entre sus funciones están la opsonización de antígenos, neutralización de virus, solubilización de inmunocomplejos, lisis de bacterias y virus. La intervención en los procesos inflamatorios, facilita la quimiotaxis y la vasodilatación (40).

La mayoría de componentes del complemento son sintetizados por los hepatocitos en el hígado y constituyen el 15 % de las proteínas globulinas

del plasma, estas glucoproteínas se encuentran distribuidas entre el plasma y la membrada de diversas células. Una pequeña proporción es producida por los macrófagos tisulares, monocitos, células epiteliales del tracto intestinal y fibroblastos (42).

Para la activación del complemento se reconocen tres vías, la vía clásica, la que fue descubierta primero y es dependiente de inmunocomplejos de antígeno – anticuerpo; la vía alterna, dependiente de sustancias localizadas en la superficie de microorganismos y por último la vía de las lectinas que se une a manosa (56).

La vía clásica forma parte de la respuesta inmune adaptativa, esta vía tiene tres componentes, complejos antígeno-anticuerpo, el componente de reconocimiento C1 y Enzimas del complemento (42).

Para la activación de la vía clásica es necesario la presencia de los inmunocomplejos que son formados por antígenos solubles o particulados y anticuerpos de las clases IgM e IgG (excepto IgG4), estos anticuerpos también se unen con determinantes antigénicos o epítomos que se encuentran en la superficie de las membranas celulares de patógenos (42).

Los componentes del complemento C1, C2, C3 y C4 que están involucrados en la fase inicial, se encuentran presentes en el plasma como zimógenos. La formación del inmunocomplejo conlleva a un cambio conformacional en la porción FC del anticuerpo, exponiendo así un sitio de unión para C1, en el suero esto es un complejo macromolecular con una molécula de C1q y dos moléculas de las serinas proteasas C1r y C1s

mantenidas juntas en un complejo estabilizado por Ca^{2+} (C1qr2s2) (42,57).

Un antígeno multivalente unido al anticuerpo IgM metamérico adopta una configuración en “grapa”, por lo cual quedan expuestos sitios de unión para C1q. de esta manera la molécula de Ig M forma un complejo antígeno anticuerpo y se une a C1q (57).

Una de las moléculas de C1 se convierte en una enzima serina proteasa activa inducida por la unión de la C1q a los dominios CH2 de las regiones FC del anticuerpo que conforma un complejo. Posteriormente C1r divide y activa a su molécula par C1i, estas dos moléculas luego dividen y activan a las dos moléculas C1s, C1s tiene como sustratos a C4 y C2. La primera es activada tras la hidrólisis de C1s a un fragmento pequeño C4a. Por otro lado, el fragmento C4b, dentro de la población C1, se fija de manera covalente a la superficie de la membrana blanco, y después se une a C2 (42,57).

Cuando C2 se une a C4b se hace muy susceptible a la división por la enzima C1s cercana, el fragmento pequeño C2b se difunde dejando un complejo C4b2a activo enzimáticamente. Así, en este complejo, C2a es el fragmento que tiene actividad enzimática solo en unión a C4b; este complejo C4b2a recibe el nombre de C3 convertasa, esta enzima C3 convertasa unida a membrana luego hidroliza generando dos fragmentos C3a la anafilatoxina y el fragmento fundamental C3b (42).

Las moléculas de C3b se unen a la enzima C4b2a a la membrana para formar el complejo de C5 convertasa unido a membrana, trimolecular,

C4b2a3b. El componente C3b de este complejo se une a C5, luego este complejo divide a C5 hacia los dos fragmentos que son C5b y C5a. Por consiguiente, C4b2a3b se convierte en la C5 convertasa de la vía clásica. Luego C5b forma el MAC con C6, C7, C8 y C9 (42,58).

C5 inicia la generación del MAC, las reacciones del complemento tienen lugar sobre la superficie de los microorganismos o sobre los inmunocomplejos. Cuando C5b se une a C6 y C7, el complejo resultante hace un cambio en su estructura de tal manera que expone regiones hidrofóbicas sobre la superficie del componente C7 con capacidad de insertarse en el interior de la membrana de los microorganismos. C8 β y C8 $\alpha\gamma$ son cadenas peptídicas de C8. C8 β que se une al complejo C5b67 induciendo un cambio conformacional en el dímero de C8, de modo que el dominio hidrofóbico de C8 $\alpha\gamma$ puede insertarse en el interior de la membrana de fosfolípido (42,58).

El complejo C5b678 puede formar un poro pequeño de 10 Å de diámetro, y la formación de este llevar a lisis de eritrocitos; sin embargo, no sucede lo mismo con células nucleadas (42).

La unión y la polimerización de C9 al complejo C5b678 (10 a 19 moléculas) conforma el paso final en la formación del MAC. El MAC completado, que tiene una forma tubular y un diámetro de poro funcional de 70 a 100 Å, consta de un complejo C5b678 rodeado por un complejo de poli-C9; con esto, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática lleva de modo irreversible a muerte celular (42,58).

Los metabolitos de algunas especies vegetales tienen capacidad de modular la actividad del sistema del complemento en sus vías clásica y alterna. Los extractos etanólicos de la hoja de *Ternstroemia tepezapote* y *Lippia chiapasensis* presentan actividad inhibitoria de la vía clásica del sistema de complemento. La actividad inhibitoria del complemento puede deberse a efectos de interferencia con C1, C2, C3, C4 e IgG; también a la presencia de agentes quelantes de los cationes divalentes Ca^{+2} y Mg^{+2} . Además, es importante eliminar la presencia bacteriana en las soluciones de trabajo, ya que los lipopolisacáridos de membrana de bacterias pueden generar la activación del sistema del complemento (18,59).

También los aceites esenciales ricos en fenoles de tomillo rojo, orégano español y estragón demostraron actividad inhibitoria de la vía clásica del complemento, siendo el carvacrol un componente del orégano español el que presentó mayor actividad inhibitoria (59).

2.2.11. Inmunomodulación

La inmunomodulación es un enfoque terapéutico y una rama desafiante de la medicina donde se interviene en los procesos de autorregulación y homeostasia del sistema inmune. Concretamente, este término se refiere a la acción que ejercen los medicamentos químicos, moléculas vegetales o antígenos microbianos sobre mecanismos tanto de la inmunidad innata como adquirida, lo que puede conllevar directa o indirectamente a otros efectos como la actividad antimicrobiana. Los compuestos que ejercen esta acción se denominan inmunomoduladores (60,61).

Los Inmunomoduladores de acción específica ejercen su acción sobre células del sistema inmune en presencia de un antígeno o inmunógeno, por lo que hay una acción específica de estas células para producir una respuesta. En cambio, los inmunomoduladores de acción inespecífica son agentes que estimulan o suprimen la respuesta inmune sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado (61).

Estos actúan de distintas maneras, los de tipo I actúan sobre el sistema inmune normal, los de tipo II actúan sobre el sistema inmune inmunodeprimido y los de tipo III actúan sobre ambos. En algunos casos, los compuestos ejercen su actividad inmunomoduladora de manera simultánea con otros efectos, por ejemplo, la acción antitumoral directa y la actividad proliferativa sobre células mononucleares de sangre periférica humana, generado por un aumento en la producción de IL-2 por *Andrographis paniculada* (62).

Los inmunomoduladores producen un efecto biológico o farmacológico sobre los mecanismos moleculares y celulares que gobiernan el equilibrio de la respuesta inmune, de acuerdo a la acción ejercida estos compuestos pueden ser inmunopotenciadores o inmunosupresores (63). Los inmunopotenciadores cumplen funciones importantes en la inmunodeficiencia por infección viral o bacteriana, y especialmente en el tratamiento del cáncer, en donde las radiaciones y los medicamentos anticancerosos rompen el equilibrio del sistema inmune, y en la inmunodeficiencia por VIH. En cambio, la inmunosupresión es la inhibición de uno o más componentes del sistema inmunitario adaptativo

o innato, que puede producirse como resultado de una enfermedad subyacente o de forma intencional con el propósito de prevenir o tratar el rechazo del trasplante de órganos o una enfermedad autoinmune (63).

2.2.12. Los inmunofármacos

Son biomoléculas que pueden tener un origen sintético y/o también un origen biológico; con capacidad de modular, suprimir y estimular la inmunidad adaptativa o innata, los mismos que son conocidos también como inmunomoduladores, inmunorestauradores, inmunoaumentadores o modificadores de la respuesta biológica (63). Si bien, los inmunomoduladores sintéticos y los anticuerpos monoclonales son utilizados ampliamente en la medicina, estos, tienen limitaciones para su uso general; como la generación de náuseas, hiperglucemia, hipertensión, hiperuricemia, malestar gastrointestinal e infarto de miocardio (63). Por el cual, se necesitan inmunomoduladores que aseguren la inocuidad para el organismo. De ahí la importancia de los inmunomoduladores naturales de origen vegetal de constituirse como agentes potenciales para sustituir a los sintéticos en diferentes regímenes terapéuticos (63). Estos inmunomoduladores de origen vegetal son fitoquímicos que incluyen aceites esenciales, esteroides, terpenoides, fenólicos, pigmentos, flavonoides y alcaloides, etc (63).

Los inmunoadyuvantes son compuestos de origen químico y biológico que potencian, estimulan o incrementan la acción de las vacunas y por ende hacen mucho más efectiva la respuesta inmunológica tanto a nivel celular y humoral (6,64). Por otro lado, están los inmunoestimulantes que son

compuestos químicos y naturales que modulan la respuesta inmune innata y adaptativa de manera positiva, y finalmente los inmunosupresores (6,64).

2.2.13. Plantas que modulan la respuesta inmune

Los vegetales y sus metabolitos han sido utilizados como medicina por su efecto inmunomodulador sobre la función del sistema inmune innato y adaptativo, a través de la estimulación de la inmunidad humoral, la interferencia con las vías proinflamatorias y la modulación del microbioma intestinal (65).

Aloe vera

Pertenece a la familia de las Liliaceae, es una planta que se ha utilizado ampliamente en productos preventivos, medicinales y cosméticos. Esta planta es estudiada debido a sus propiedades inmunomoduladoras, antimicrobianas, actividad antiinflamatoria, cicatrizante, anticancerígena, antivirales y efectos antioxidantes. Su composición fitoquímica está conformada por polisacáridos entre los cuales el más estudiado es el acemanano, por su actividad inmunomoduladora mediada por la activación del sistema inmune innato. Este polisacárido activa las células dendríticas a través de los receptores de manosa, presenta efectos inmunomoduladores mediante la interacción con los receptores tipo Toll (TLR) e induce la expresión de la interleucina (IL) 6/8 en fibroblastos gingivales. Los extractos de *Aloe vera* incrementan la efectividad de la vacuna contra el virus del papiloma humano en ratones. Los metabolitos obtenidos de esta planta tuvieron mejor actividad fagocítica, producción de óxido nítrico e IL-6 cuando se extrajeron de plantas en época de lluvia (66,67).

***Echinacea purpurea* (L.) Moench**

Planta de la familia Asteraceae que es utilizada en la medicina tradicional, la parte floral y raíz para curar dolores de garganta, cicatrización de heridas y patologías respiratorias. Esta planta tiene en su composición química ácidos fenólicos, saponinas, alquilamidas, polisacáridos, flavonoides y alcaloides, que le dan propiedades inmunoestimulantes para activar las células NK, los neutrófilos y macrófagos. Además de potenciar el proceso de fagocitosis e incrementar el número de linfocitos T (68,69).

***Panax ginseng* C.A. Meyer**

Pertenece a la familia Araliaceae, planta medicinal universal de la que se utiliza la raíz. Su composición química principal está dada por los ginsenósidos, estas saponinas son las responsables de las propiedades de esta planta. Una de sus propiedades es la capacidad inmunoestimulante al aumentar el número de células NK, linfocitos T e intensificar la fagocitosis, y la producción de citocinas. Su actividad inmunomoduladora está ligada a su actividad anticancerígena (14).

Existen diversos métodos *in vitro* e *in vivo* para comprobar la actividad inmunomoduladora de los vegetales, así tenemos los ensayos *in vitro* para la valoración de la actividad del sistema del complemento. Que se fundamenta en la hemólisis del eritrocito por el complejo de ataque a la membrana (MAC) generado al activarse el sistema del complemento. Los eritrocitos actúan como activadores y como células blanco, estos poseen antígenos de superficie que van a reaccionar con los anticuerpos

específicos del suero y su lisis va dar lugar a la liberación de la hemoglobina (70).

Sin embargo, es necesario realizar varios ensayos *in vitro*, ya que no hay un sistema maestro o una célula única que regule y gobierne las diversas vías inmunológicas. Entre los ensayos *in vitro* disponibles en la actualidad, los más importantes son aquellos que permiten determinar el estado funcional y la eficiencia del sistema de los fagocitos. Se consideran de segunda elección las pruebas que miden la actividad sobre el sistema del complemento y sobre la población de linfocitos T (70).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Nivel de la Investigación

Descriptivo

3.2. Tipo y diseño de estudio

Investigación de tipo básica de diseño experimental con estímulo creciente con controles.

3.3. Material biológico

El material biológico consistió en frondas y rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger (calaguala). Esta planta crece durante todo el año; en la época de verano se presentan con hojas de color amarillento y su crecimiento óptimo se da en época de lluvia. Crece en las zonas frías de Cajamarca a 2 500 a 3 000 m s.n.m. (7).

Unidad de estudio

La unidad de estudio consistió en el extracto hidroalcohólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger (calaguala).

3.4. Colección del material biológico

El sitio de colección del material biológico está ubicado en el caserío Agomarca San Antonio, localidad Adamayo, en las siguientes coordenadas geográficas, 2 912 m s.n.m., 7°12'23" latitud sur 78°30'15" longitud oeste en el distrito, provincia y departamento de Cajamarca. El terreno en el cual se realizó la colecta

es relativamente rocoso con vegetación, es un área donde *N. crassifolium* crece de manera silvestre en el margen de la quebrada. Los puntos de recolección fueron determinados en función de la densidad vegetal y de zonas libres de contaminación visible.

Una vez ubicada las plantas fueron elegidas aquellas que presentaron frondas limpias con apariencia sana. Con la ayuda de una picota se procedió a descubrir los rizomas, las plantas fueron extraídas de la tierra sin separar las frondas de los rizomas hasta completar la cantidad de 2 kg de peso entre rizomas más frondas, se eliminaron los restos de tierra y se almacenó en papel kraff para transportarlo hasta el lugar más cercano donde se lavaron las muestras con agua potable. Las frondas muy jóvenes o amarillas fueron separadas; a los rizomas se le quitó la cubierta de escamas con ayuda de una escobilla; tanto rizomas como frondas fueron envueltos en papel kraff y se transportaron en cadena de frío hasta el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca (UNC).

3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.5.1. Tratamiento de material biológico

En el laboratorio, las frondas y rizomas por separado, fueron desinfectados mediante inmersión en agua potable con hipoclorito de sodio al 1 % por 10 minutos y se enjuagó por tres veces con agua destilada estéril (71,72)

3.5.2. Obtención del extracto hidroalcohólico de *Niphidium crassifolium* (L.)

Lellinger

Esta metodología se realizó según lo descrito por Attard y Cuschier, para lo cual se pesó 1/2 kg de frondas y 1/2 kg de rizomas por separado en una

balanza electrónica digital, previamente lavados y desinfectados como se indica en el apartado anterior, se procedió a cortar en trozos pequeños para facilitar la deshidratación, posteriormente estas muestras de hojas y rizomas se secaron en una estufa con temperatura entre 38 °C a 40 °C hasta llegar a un peso constante, para determinar si finalmente las muestras llegaron a peso constante se realizaron pesajes cada dos horas, cuando el valor del peso de la muestra fue el mismo en los tres últimos pesajes indicando deshidratación total, se pulverizó para obtener polvos finos haciendo uso de una licuadora (70).

En una balanza analítica se pesaron 40 g de la muestra de rizomas y 40 g de la muestra de frondas, ambas muestras se llevaron a macerar en 250 mL de etanol al 96% por separado, durante 7 días con agitación manual de manera periódica, lo cual consistió en agitar la muestra dos veces por día, por la mañana y tarde durante 10 minutos. Luego los extractos en maceración se filtraron con papel filtro Whatman N°1 y se secaron en una estufa a 38 °C para obtener extractos sólidos deshidratados que fueron almacenados en refrigeración a 4 °C hasta su uso; los mismos que posteriormente se solubilizaron en medio RPMI 1640 para preparar soluciones en las cinco concentraciones de los tratamientos (19).

3.5.3. Determinación cualitativa de los principales compuestos bioactivos presentes en *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger

Esta etapa de evaluación nos permitió determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en *N. crassifolium* (L.) Lellinger, para lo cual se utilizó el extracto seco de rizomas y frondas de esta planta.

Ensayo de Espuma

Para este ensayo se diluyeron 500 mg del polvo fino proveniente de ambos extractos en 10 mL de agua destilada en un tubo de ensayo por separado. Esta solución se agitó manualmente durante 1 min y se dejó reposar por 15 min. Seguidamente se midió con una regla la altura de espuma, 15 mm (+++) indicó un alto contenido de saponinas (73).

Prueba de Baljet

Esta prueba se realizó para la detección de lactonas sesquiterpénicas. Se colocaron 5 mL de la solución hecha a partir de los extractos tanto de rizomas como de frondas en tubos de ensayo, a esto se adicionó 3 gotas del reactivo de Baljet; un cambio de coloración de naranja a rojo demostró la presencia de lactonas sesquiterpénicas(73).

Ensayo de Fehling

Esta prueba permite reconocer la presencia de azúcares reductores. Las soluciones A (1 mL) y B (1 mL) se mezclaron en cantidades iguales (1:1) justo en el momento de realizar el ensayo, esta mezcla es la que se adicionó a la alícuota a evaluar. Para ello, el extracto seco de frondas y rizomas se disolvió en 2 mL de agua, a esta solución se adicionó 2 mL del reactivo de Fehling y se calentó en baño maría por 10 minutos esta mezcla. El ensayo se consideró positivo si la solución se coloreó de rojo o apareció un precipitado rojo luego de los 10 minutos (19).

Prueba de Wagner

Se agregó 5 gotas de una solución de yoduro de potasio, (reactivo de Wagner) a cada una de las alícuotas preparadas a partir del extracto seco de rizomas y frondas en tubos de ensayo. Esta prueba de alcaloides fue considerada positiva al virar la alícuota a un color marrón rojizo (73).

3.5.4. Preparación de diluciones del extracto hidroalcohólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger

Una vez obtenido el extracto en polvo tanto de rizomas como frondas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger, se disolvieron en el medio RPMI-1640 (Sigma – Aldrich) en las siguientes concentraciones: 1000 µg /mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL y 62 µg/mL. Al inicio se humedeció el extracto en polvo con una gota de DMSO, de tal manera que la cantidad de DMSO no supere el 0.25% de la solución completa. Las soluciones fueron esterilizadas por filtración con un filtro de jeringa de poro 0,2 µm. Finalmente, las soluciones fueron refrigeradas a 4°C en frascos cubiertos con papel aluminio hasta su uso (16,70).

3.5.5. Determinación de la capacidad inmunomoduladora sobre la proliferación linfocitaria del extracto hidroalcohólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger

Muestras sanguíneas

Estas muestras fueron tomadas en un volumen de 4 mL de sangre periférica del antebrazo en tubos con tapa verde y anticoagulante heparina de litio, según el procedimiento estándar establecido por el Instituto Nacional de Salud (INS); estas muestras se tomaron de cinco individuos varones sanos

de 18 a 27 años de edad, fueron personas que no estuvieron consumiendo algún tipo de fármaco, los donantes firmaron un consentimiento informado. Una vez tomada la muestra se dejó reposar como máximo 30 minutos hasta su uso (70).

Aislamiento de linfocitos mediante la técnica de centrifugación en gradiente

En este apartado, se procedió a diluir 3 mL de sangre anticoagulada con heparina de litio (muestra tomada en tubos con tapa verde) con 3 mL de solución salina fosfatada (PBS) (Sigma–Aldrich) a un pH 7,4. Luego se colocaron 3 mL de Histopaque®-1077 (Sigma–Aldrich) con densidad 1.077 g/mL en tubos cónicos de plástico estéril de capacidad 15 mL (a temperatura ambiente para no modificar la densidad). Seguidamente se agregó cuidadosamente 6 mL de la sangre diluida sobre el medio Histopaque®-1077 del tubo cónico de manera suave para no mezclar y con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Posteriormente se procedió a centrifugar a 2 500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente, con paradas de cada 5 minutos para que no se eleve la temperatura interna del equipo y no se modifique la densidad del histopaque. Luego, cuidando de no mezclar las capas, se procedió a sacar los tubos de la centrífuga y se aspiró el plasma (capa superior) con una pipeta Pasteur, delicadamente, dejando intacto el anillo blanquecino de células mononucleares en la interface medio Histopaque y plasma. Se aspiró el anillo blanquecino donde se encuentran los linfocitos y monocitos (células mononucleares) sin recoger el Histopaque®-1077 de la siguiente capa, se depositó las células en un tubo estéril para lavarlas agregando 5 mL de RPMI-1640 a 37 °C resuspendiendo suavemente con

una pipeta Pasteur. Se tuvo mucho cuidado al manipular las suspensiones celulares ya que son muy sensibles a fuerzas mecánicas, así como a la osmolaridad y todos los componentes de la solución en que se encuentran suspendidas, ya que esto afectaría directamente a la viabilidad celular (50,74,75).

Seguidamente se llevó a centrifugar a 2 000 rpm por 10 minutos las células suspendidas en 5 mL de medio RPMI, luego se eliminó el sobrenadante mediante la inversión rápida del tubo, las células mononucleares que quedaron adheridas al fondo del tubo formando un botón se lavaron agregando nuevamente 5 mL de RPMI-1640 a 37 °C resuspendiendo suavemente con una pipeta Pasteur estéril y se llevó nuevamente a centrifugar a 2 000 rpm por 10 minutos, esto se repitió una vez más. Después del tercer lavado, las células fueron resuspendidos suavemente en 500 µL de medio preparado RPMI - 1640 (medio RPMI más suero bovino fetal 10 % y mezcla de antibióticos 1 %) a 37 °C (50,74,75).

Seguidamente se comprobó el porcentaje de viabilidad celular, mezclando en un tubo Eppendorf partes iguales (20 µL + 20 µL) la suspensión celular y el colorante azul de tripán (esterilizado por filtración) y se llevó a recuento en una cámara Neubauer o hemocitómetro. Inmediatamente se observó al microscopio para contar en cuatro cuadrantes las células viables (claras), distinguiéndolas de las dañadas o no viables (azules); se calculó el promedio de células viables, no viables y totales, para finalmente obtener el porcentaje de viabilidad el cual es determinante en la proliferación celular de los cultivos (50,74).

Ensayo de proliferación celular in vitro

Luego del tercer lavado de las células mononucleares (linfocitos y monocitos) y la determinación del porcentaje de viabilidad siendo esto 96 %, se sembraron en placas ELISA de 96 pocillos de fondo plano 150 µL de RPMI -1640 preparado, conteniendo 10% de suero bovino fetal (Sigma - Aldrich) y 1 % de mezcla de antibióticos (100 U de penicilina / mL, 100 µg de estreptomina / mL y 100 U de anfotericina). A cada pocillo con medio RPMI -1640 preparado se le agregó 75 µL de suspensión celular más 75 uL de mitógeno Fitohemaglutinina (Sigma - Aldrich) a una concentración de 5 µg/mL y se incubó en condiciones estándar (37 °C, aire humidificado y 5% de CO₂) (74).

Las células se dejaron en incubación por 48 h en condiciones estándar y luego se trataron con 100 µL de las siguientes concentraciones del extracto hidroalcohólico de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL y 62 µg/mL, a los controles positivos se les agregó 100 µL de RPMI 1640 preparado dejando a las células solo en contacto con el medio de cultivo preparado y el mitógeno, cada tratamiento se realizó con sus respectivas repeticiones. Las placas se incubaron por 96 h más, haciendo un total de 144 h.

Este mismo procedimiento se repitió para los tratamientos con extracto hidroalcohólico de frondas (74). Todos los experimentos se realizaron con sus repeticiones correspondientes como lo indica la distribución en el Cuadro1.

Cuadro 1. Distribución de los tratamientos en la microplaca de Elisa, para extractos de frondas y rizomas.

Repet.	Tratamientos con diferentes concentraciones del extracto más control positivo.					
	1	2	3	4	5	6
A1	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C +
A2	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C +
B1	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C +
B2	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C +
C1	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C +
C2	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C +

Cuantificación del crecimiento celular

Después de 144 h de incubación en total, 48 h sin extracto hidroalcohólico y 96 h con las respectivas concentraciones del extracto hidroalcohólico de frondas y rizomas, correspondiente a los tratamientos, se procedió a extraer 80 µL de suspensión celular en una placa ELISA agitando suavemente y se agregó 8 µL de la solución Cell Counting Kit-8 (CCK-8 Sigma-Aldrich) a cada pocillo, según las indicaciones del protocolo del producto (10:100). Esto se realizó por separado para los tratamientos con los dos tipos de extractos (rizomas y frondas). En seguida se llevó a incubar las placas con los tratamientos a 37°C, 5 % de CO₂ y aire humificado constante por 2 horas. Finalmente se llevó a medir la densidad óptica a 450 nm en el lector de ELISA. La manipulación de los extractos y cultivos celulares se realizó bajo condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar (74,76).

Identificación de linfocitos T mediante la formación de rosetas E

Para este procedimiento se necesitó eritrocitos de carnero, para el cual se obtuvo sangre de carnero mediante venopunción con el sistema de

extracción vacutainer. Una vez tomada la muestra se transportó hacia el laboratorio de microbiología de la UNC. En el laboratorio, se mezclaron 4 mL de sangre de carnero con 4 mL de solución Alsever, posteriormente se almacenó en refrigeración (4°C) hasta su uso (50).

Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron por el método descrito en el ítem de proliferación celular. Paralelamente, se lavaron los eritrocitos de carnero mantenidos en anticoagulante de Alsever por 4 veces con solución salina al 0,90 %, se centrifugó a 1 500 rpm por 5 minutos para separar los eritrocitos en el fondo del tubo; luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los eritrocitos en 8 mL de solución salina al 0,90 % (50).

Esta suspensión de eritrocitos de carnero se procedió a centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos, este paso se repitió por 2 veces más hasta separar eritrocitos de buena calidad para su siguiente uso, finalmente se resuspendieron los eritrocitos en PBS al 0,5% v/v (0,05 mL de eritrocitos empacados en 10 mL de PBS). Posteriormente, se mezclaron 0,1 mL de eritrocitos suspendidos en PBS y 0,1 mL de suspensión celular de linfocitos cultivados luego de las 144 h de incubación, además se agregó 20 µL de suero fetal bovino (previamente inactivado por calor por 30 min a 56°C) y se llevó a centrifugar a 200 rpm durante 5 min, finalmente se dejó en reposo por 12 horas a temperatura ambiente, sin causar agitación en el botón de células (50).

Pasado este tiempo, se agregó 100 µL de azul tripán para luego resuspender suavemente las células inclinando el tubo hasta una posición casi

horizontal y rotándolo lentamente por 20-30 segundos. Luego, con una pipeta Pasteur sin bulbo se procedió a transferir por capilaridad una gota de la suspensión a una cámara de recuento celular y se observó en el microscopio a 40X y se anotó como "rosetas" aquellos linfocitos que poseen 3 o más eritrocitos adheridos (50).

3.5.6. Determinación del efecto inmunomodulador del extracto de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger sobre la fagocitosis polimorfonuclear

Se utilizó sangre venosa periférica de cinco personas de 18 a 27 años de edad para la obtención de neutrófilos polimorfonucleares, esto se realizó mediante la centrifugación en gradiente de densidad de acuerdo al procedimiento descrito en el ítem de proliferación celular, donde los neutrófilos van al fondo del tubo con los eritrocitos sedimentados. Se utilizó ese sedimento con células polimorfonucleares y eritrocitos (RBC-PMN) para realizar los tratamientos con los extractos (77).

Se consiguió una cepa de *Candida Albicans* aislada y caracterizada en otro trabajo de investigación, se reactivó la cepa en medio de cultivo agar nutritivo y se incubó por 24 horas. Luego con esta cepa se preparó una suspensión con turbidez correspondiente al tubo N°6 de MC Farland de la escala de turbidez estándar. Para realizar la prueba de fagocitosis a cada tubo Eppendorf se agregó las siguientes soluciones y en el orden correspondiente: 100 µL de suero humano, 100 µL de extracto hidroalcohólico de cada concentración (1000 µg /mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL y 62 µg/mL; para el control se agregó 100 µL de

solución de Hank), 400 μ L de sedimento RBC – PMN y 200 μ L de suspensión de *C. albicans* (se agregó justo antes de incubar cada grupo de muestras) (77,78).

Se realizó la distribución de los tubos Eppendorf en una gradilla para realizar los 5 tratamientos con sus repeticiones, para los dos tipos de extractos. Cada grupo de tubos fueron incubados a 37°C, CO₂ al 5% de 30 a 45 minutos en presencia de los extractos de prueba, se trabajaron por grupos para facilitar el manejo del tiempo, ya que si se deja en incubación por más tiempo los neutrófilos fagocíticos tienden a generar apoptosis. El control fue la solución idéntica sin los extractos de prueba, adicionando la solución de Hank solo para mantener la concentración y el volumen de la solución. Finalmente, pasado los 30 minutos de incubación se procedió rápidamente a realizar los frotis sobre cubre objetos codificados para identificar el tratamiento y la repetición al que correspondía. Se dejaron secar los frotis y se realizó la coloración Wright que permitió identificar y diferenciar los tipos celulares de la sangre y *C. albicans*; una vez coloreadas las láminas porta objetos fueron observadas con el objetivo de inmersión en el microscopio para observar la actividad fagocítica de los neutrófilos (neutrófilos que contienen levaduras en su interior); se contaron 100 neutrófilos en total (fagocíticos y no fagocíticos) por cada lámina registrando el número de células con microorganismos ingeridos para determinar el porcentaje de fagocitosis y el número total de *C. albicans* fagocitadas. Los tratamientos fueron distribuidos según como indica el Cuadro 2 (77,78).

Cuadro 2. Distribución de los tubos Eppendorf en la gradilla para los tratamientos tanto para extractos de rizomas y extractos de frondas.

Repet.	Diferentes concentraciones de los extractos más control.					
	1	2	3	4	5	6
A1	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
A2	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
A3	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
B1	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
B2	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
B3	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
C1	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
C2	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
C3	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
D1	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
D2	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
D3	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
E1	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
E2	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C
E3	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62 µg/mL	C

3.5.7. Ensayo hemolítico para la valoración de la actividad del sistema de complemento mediante la vía clásica

Obtención de sangre de carnero

Se realizó mediante el método de venopunción, en tubos estériles con anticoagulante EDTA, se extrajo 6 mL de sangre de carnero cuidando mucho la esterilidad de la muestra, la misma que se llevó al laboratorio y se dejó en refrigeración a 4 °C una vez mezclado con la solución Alsever (4mL de solución Alsever y 4 mL de sangre de carnero) (18).

Preparación y Sensibilización de la suspensión de eritrocitos

Se mezclaron 2 mL de eritrocitos de carnero en solución Alsever del procedimiento anterior con 8 mL de solución salina fisiológica en un tubo Falcon, luego se procedió a centrifugar a 2 500 rpm por 5 minutos. Se removió el sobrenadante, luego se resuspendió el pellet en 10 mL de solución salina fisiológica y se llevó a centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos, se repitió este paso dos veces más hasta obtener las células empacadas en el fondo del tubo. Después se mantuvo el pellet de células empacadas sobre hielo, para luego suspender 200 μL de células empacadas en 9.8 mL de PBS y mezclar 100 μL de esta suspensión con 4.9 mL de solución salina fosfatada PBS, esta suspensión se llevó a una concentración de 1.8×10^8 eritrocitos /mL. Se mantuvo la suspensión eritrocítica en hielo hasta su próximo uso.

Se sensibilizó la suspensión eritrocítica mantenida en hielo con Amboceptor (anticuerpos anti eritrocitos de carnero), para lo cual se mezcló 1 mL de Amboceptor (diluido 1:100) y 7 ml de PBS, luego se agregó 8 mL de la suspensión eritrocítica a esta dilución, y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, luego se centrifugó para lavar a 2 500 rpm por 5 minutos con PBS tres veces. Se preparó una suspensión de eritrocitos a una concentración de 1.08×10^6 células/mL y se mantuvo en hielo hasta su utilización (esto fue la solución ShEA). Se agregó 100 μL de muestra del extracto tanto de frondas como rizomas en su respectiva placa ELISA, en los pocillos de la fila A, y se realizaron diluciones seriadas 1:2 en la fila B a la fila E (50 μL de extracto más 50 μL de PBS), partiendo de una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ para ambos extractos (18,79).

Preparación de controles para la medición de actividad sérica

Se agregó 50 µL de PBS a los pocillos de la fila F1 al F3 en cada placa ELISA (pocillos donde posteriormente se verá la actividad del suero), 50 µL de PBS a los pocillos de la fila F4 al F6 (pocillos donde posteriormente se verá la inactividad del suero); además, se agregó 100 µL de agua destilada estéril a los pocillos de la fila F10 al F12 (100 % de hemólisis por ser un medio no isotónico) (18,79).

Preparación de la dilución del suero e incubación

Se agregó 50 µL de suero inactivo (63 uL de suero inactivado a 56 °C por 30 min mezclado con 5 mL de PBS) a los pozos F4 al F6 los cuales fueron el blanco de muestra. Luego se mezclaron 125 µL de suero humano (suero activo) con 10 mL de PBS, y se agregó de esta mezcla 50 µL a los pocillos control y a los pocillos con los extractos diluidos. Luego se cubrió con papel aluminio la placa ELISA y se preincubó a 37°C por 60 min, para luego extraer la suspensión en tubos Eppendorf y centrifugar a 2500 rpm por dos minutos, después de la pre incubación se agregó 50 µL de la suspensión de ShEA (eritrocitos de carnero sensibilizados) a cada tubo. Se incubó una vez más a 37°C por 60 min cubriendo con papel aluminio toda la gradilla y finalmente se centrifugaron los tubos a 2 500 rpm por dos minutos más (18,79).

Medición de hemólisis

Para la medición de la hemólisis se agregó 200 µL de agua destilada estéril a los pocillos de una placa ELISA de fondo plano. Luego se transfirió 50 µL

de los sobrenadantes a cada pocillo según correspondía de acuerdo a los tratamientos. Finalmente se midió la DO a 405 nm en un espectrofotómetro de placa o lector ELISA, lo cual determinó la concentración de hemoglobina liberada en los sobrenadantes producto de la actividad del sistema del complemento vía clásica sobre eritrocitos de carnero (18,79).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Determinación cualitativa de los principales compuestos bioactivos presentes en *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger

Se determinó la presencia de alcaloides, lactonas sesquiterpénicas, azúcares reductores y saponinas utilizando diferentes pruebas cualitativas que arrojaron positivo para la presencia de estos compuestos bioactivos, dependiendo de la parte de la planta de donde fue obtenido el extracto, como se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales compuestos bioactivos presentes en los extractos de rizomas y frondas de calaguala.

Método de prueba	Compuestos bioactivos	Extracto de frondas *	Extracto de rizomas*
Prueba de Wagner	Alcaloides	++	-
Prueba de Baljet	Lactonas sesquiterpénicas	+	+
Ensayo de Fehling	Azúcares reductores	++	+++
Prueba de la espuma	Saponinas	++	+

Ausencia (-), presencia mínima (+), presencia notable (++), presencia abundante (+++).

* Intensidad de la presencia del compuesto bioactivo.

4.1.2. Capacidad inmunomoduladora de la proliferación linfocitaria del extracto hidroalcohólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger

Las diferentes concentraciones de los extractos obtenidos de frondas de calaguala ocasionaron modulación negativa de la proliferación de linfocitos;

sin embargo, el recuento de linfocitos en los tratamientos no mostró diferencia marcada en comparación con el grupo control, como se pudo demostrar con la prueba de análisis de varianza (ANOVA, $p = 0,133$), descrita en la Tabla 3.

En cuanto a la capacidad inmunomoduladora de la linfoproliferación del extracto hidroalcohólico de calaguala, se observó que el extracto proveniente de rizoma a las concentraciones de 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$ generaron modulación negativa marcada en la proliferación celular de linfocitos, al compararla con el control positivo (fitohemaglutinina 5 $\mu\text{g/mL}$), con diferencia estadística altamente significativa ($p < 0,000$). Sin embargo, las demás concentraciones también disminuyeron la proliferación de linfocitos, aunque en menor proporción, como se describe en la Tabla 4.

Tabla 3. Proliferación de linfocitos en los diferentes tratamientos con el extracto de frondas expresado en el promedio del recuento celular.

Tratamientos (Concentración)	Promedio \pm DE (cel/mL)	Mediana (cel/mL)	Mínimo (cel/mL)	Máximo (cel/mL)	p -valor *
1000 $\mu\text{g/mL}$	75400,00 \pm 32803,66 ^a	72800,00	28400,00	121200,00	0,133
500 $\mu\text{g/mL}$	118000,00 \pm 29021,37 ^a	114800,00	76000	160800	
250 $\mu\text{g/mL}$	89800,00 \pm 21053,46 ^a	94600,00	52000	109600	
125 $\mu\text{g/mL}$	89933,33 \pm 41574,93 ^a	104800,00	38400	138000	
62 $\mu\text{g/mL}$	75733,33 \pm 50257,36 ^a	95400,00	-6000	124000	
Control	130733,33 \pm 59005,31 ^a	103000,00	86400	232800	

* Prueba de ANOVA de un factor. Pares de grupos comparados con la prueba de Tukey, pares con la misma letra en el superíndice no presentaron diferencia estadística (p -valor $> 0,05$).

Tabla 4. Recuento promedio de linfocitos según los grupos de tratamiento (concentraciones del extracto de rizomas de calaguala) comparados con el grupo control.

Tratamientos (Concentración)	Promedio \pm DE (cel/mL)	Mediana (cel/mL)	Mínimo (cel/mL)	Máximo (cel/mL)	<i>p</i> -valor *
1000 μ g/mL	47000,00 \pm 41097,54 ^a	56200,00	-16000	97600	0,000
500 μ g/mL	42800,00 \pm 29799,33 ^a	56600,00	66800	71200	
250 μ g/mL	161400,00 \pm 76445,33 ^b	132200,00	83200	277200	
125 μ g/mL	168066,67 \pm 83704,78 ^b	186000,00	42800	252400	
62 μ g/mL	164933,33 \pm 84175,31 ^b	158400,00	46400	262800	
Control positivo	276800,00 \pm 51350,40 ^b	287400,00	182400	324000	

* Prueba de ANOVA de un factor. ^{a,b} Pares de grupos comparados con la prueba de Tukey, pares con la misma letra en el superíndice no presentaron diferencia estadística; grupos con distinta letra presentaron diferencia significativa (*p*-valor < 0,05).

Identificación de linfocitos T mediante formación de rosetas E

Con respecto a la identificación de los linfocitos T, esta se hizo mediante la observación microscópica de la adhesión de los eritrocitos de carnero a los linfocitos T formando las denominadas rosetas E, como se observa en la Figura 2.

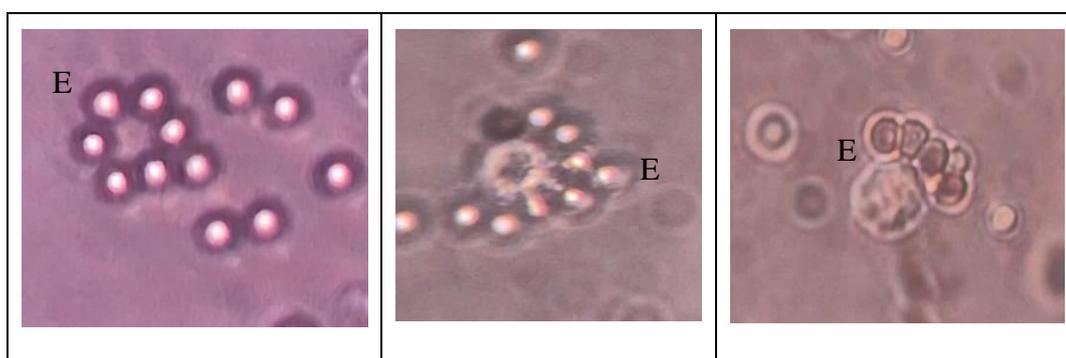


Figura 2. Linfocitos T formando rosetas (E) por la unión con eritrocitos de carnero, observación a 40 X.

4.1.3. Efecto inmunomodulador del extracto de *Niphidium crassifolium* (L.)

Lellinger sobre la fagocitosis polimorfonuclear

En cuanto al efecto inmunomodulador del extracto de frondas de calaguala sobre la fagocitosis se evidenció que las concentraciones de 125 µg/mL o menores a ella estimularon la actividad fagocítica de los neutrófilos mejor que los otros tratamientos, incluyendo el control. El porcentaje promedio fue de 13,97 %, el cual fue significativamente distinto ($p < 0,05$) como se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje promedio de neutrófilos fagocitando según los grupos de tratamiento (concentraciones del extracto de frondas de calaguala) comparados con el grupo control.

Tratamientos (Concentración)	Promedio ± DE (%)	Mediana (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	<i>p</i> -valor *
250-1000 µg/mL	1,44 ± 1,50 ^a	1,00	0,00	6,00	0,000
< 125 µg/mL	13,97 ± 7,62 ^b	13,00	1,00	28,00	
Control	2,60 ± 3,04 ^a	2,00	0,00	11,00	

* Prueba H de Kruskal-Wallis. ^{a,b} Pares de grupos con la misma letra en el superíndice no presentaron diferencia estadística; grupos con distinta letra presentaron diferencia altamente significativa (p -valor = 0,000).

Con respecto al efecto de rizomas de calaguala los tratamientos de 125 µg/mL y 62 µg/mL fueron los que estimularon en mayor porcentaje la actividad fagocítica de los neutrófilos, con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,005$) en comparación con los otros tratamientos incluyendo el control, como se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje promedio de neutrófilos fagocitando según los grupos de tratamiento (concentraciones del extracto de rizomas de calaguala) comparados con el grupo control.

Tratamiento (Concentración)	Promedio ± DE (%)	Mediana (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	p-valor *
1000 µg/mL	1,53 ± 1,25 ^a	1,00	0,00	4,00	0,000
500 µg/mL	1,87 ± 1,89 ^a	2,00	0,00	6,00	
250 µg/mL	0,93 ± 1,22 ^a	1,00	0,00	4,00	
125 µg/mL	17,00 ± 5,93 ^b	17,00	11,00	28,00	
62 µg/mL	10,93 ± 8,09 ^b	7,00	1,00	24,00	
Control	2,60 ± 3,04 ^a	2,00	0,00	11,00	

* Prueba H de Kruskal-Wallis. ^{a,b} Pares de grupos con la misma letra en el superíndice no presentaron diferencia estadística; grupos con distinta letra presentaron diferencia altamente significativa (p -valor < 0,005).

En cuanto al efecto inmunomodulador del extracto de frondas de calaguala sobre la fagocitosis en neutrófilos, expresado en el recuento de levaduras fagocitadas, también se evidenció que las concentraciones de 125 µg/mL o menores a ella estimularon las mayores cantidades de levaduras fagocitadas por los neutrófilos en comparación a los otros tratamientos, incluyendo el control. El recuento promedio fue de 19,93 levaduras, el cual fue significativamente distinto ($p < 0,05$) como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Recuento promedio de levaduras fagocitadas por células polimorfonucleares tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de frondas.

Tratamiento (Concentración)	Promedio ± DE (Lev.)	Mediana (Lev.)	Mínimo (Lev.)	Máximo (Lev.)	p-valor *
250-1000 µg/µL	1,96 ± 2,29 ^a	1,00	0,00	10,00	0,000
< 125 µg/µL	19,93 ± 11,9 ^b	19,00	1,00	51,00	
Control	2,47 ± 2,42 ^a	2,00	0,00	8,00	

* Prueba H de Kruskal-Wallis. ^{a,b} Pares de grupos con la misma letra en el superíndice no presentaron diferencia estadística; grupos con distinta letra presentaron diferencia altamente significativa (p -valor = 0,000).

En cuanto al efecto de rizomas de calaguala sobre el recuento promedio de levaduras fagocitadas, solo el tratamiento de 62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estimuló la actividad fagocítica polimorfonuclear del mayor número de levaduras, con diferencias estadísticas significativas ($p < 0,005$) en comparación con los otros tratamientos incluyendo el control, como se observa en la Tabla 8.

Tabla 8. Recuento promedio de levaduras fagocitadas por células neutrófilas polimorfonucleares tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de rizomas.

Grupo (Concentración)	Promedio \pm DE (Lev.)	Mediana (Lev.)	Mínimo (Lev.)	Máximo (Lev.)	<i>p</i>-valor *
1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	6,60 \pm 3,40 ^a	6,00	2,00	16,00	0,000
500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	7,60 \pm 6,18 ^a	5,00	1,00	19,00	
250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	4,73 \pm 3,93 ^a	4,00	0,00	12,00	
125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	5,73 \pm 6,24 ^a	3,00	0,00	19,00	
62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	15,87 \pm 6,70 ^b	16,00	6,00	28,00	
Control	6,93 \pm 3,77 ^a	6,00	2,00	13,00	

* Prueba H de Kruskal-Wallis. ^{a,b} Pares de grupos con la misma letra en el superíndice no presentaron diferencia estadística; grupos con distinta letra presentaron diferencia altamente significativa (p -valor $< 0,005$).

4.1.4. Valoración de la actividad del sistema de complemento mediante el ensayo hemolítico

La valoración de la actividad del complemento de la vía clásica se realizó mediante la cuantificación de la hemoglobina liberada por acción del complejo de ataque a la membrana (MAC) en eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina (anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero). Solo el tratamiento de 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del extracto de frondas mostró diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) en comparación a los demás tratamientos y al control negativo (suero inactivo), como se describe en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores promedio de Hb liberada durante los tratamientos con diferentes concentraciones del extracto de frondas de calaguala.

Grupo (Concentración)	Promedio ± DE (g/dL)	Mediana (g/dL)	Mínimo (g/dL)	Máximo (g/dL)	p - valor *
500 µg/mL	44,47 ± 1,89 ^a	44,58	41,50	46,83	0,001
250 µg/mL	38,06 ± 2,26 ^b	38,08	34,83	40,83	
125 µg/mL	38,03 ± 2,70 ^b	37,83	35,17	41,50	
62,5 µg/mL	37,83 ± 3,26 ^b	37,67	34,33	41,83	
31,25 µg/mL	41,64 ± 15,75 ^b	35,58	31,83	73,50	
Suero activo	50,17 ± 8,67 ^a	48,17	42,67	59,67	
Suero inactivo	32,78 ± 2,41 ^b	34,00	30,00	34,33	
Agua destilada	68,78 ± 1,92 ^a	68,83	66,83	70,67	

* Prueba H de Kruskal-Wallis. ^{a,b} Pares de grupos con la misma letra en el superíndice no presentaron diferencia estadística; grupos con distinta letra presentaron diferencia altamente significativa (p -valor < 0,005).

Con los tratamientos utilizando extractos de rizoma de calaguala no se observó diferencia estadística entre los promedios de hemoglobina liberada en comparación a los demás tratamientos, solo hubo diferencia estadística frente a los controles. Al analizar los valores de los promedios en (g/dL) se encuentra que todos los tratamientos difieren con el control de suero inactivo, mayormente el tratamiento 31,25 µg/mL, como se detalla a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores promedio de Hb liberada durante los tratamientos con diferentes concentraciones del extracto de rizomas de calaguala.

Grupo (Concentración)	Promedio ± DE (g/dL)	Mediana (g/dL)	Mínimo (g/dL)	Máximo (g/dL)	p - valor *
500 µg/mL	43,11 ± 2,51 ^c	42,92	42,92	47,00	0,005
250 µg/mL	41,86 ± 5,92 ^c	39,58	36,50	52,67	
125 µg/mL	39,28 ± 4,27 ^c	37,50	35,83	47,50	
62,5 µg/mL	39,53 ± 5,29 ^c	38,25	35,00	50,00	
31,25 µg/mL	46,67 ± 11,52 ^c	44,92	33,67	62,33	
Suero activo	50,17 ± 8,67 ^b	48,17	42,67	59,67	
Suero inactivo	32,78 ± 2,41 ^a	34,00	30,00	34,33	
Agua destilada	68,78 ± 1,92 ^b	68,83	66,83	70,67	

* Prueba H de Kruskal-Wallis. ^{a,b,c} Pares de grupos con la misma letra en el superíndice no presentaron diferencia estadística; grupos con distinta letra presentaron diferencia altamente significativa (p -valor < 0,005).

4.2. Discusión

La actividad inmunomoduladora de un extracto vegetal depende en gran medida de la composición de sus metabolitos. La Calagualina es una saponina presente en las Polipodeaceas y es a quien se le atribuye el efecto inmunosupresor de la proliferación de leucocitos en otros estudios (31). Durante el ensayo de la espuma, el extracto de *N. crassifolium* (L.) Lellinger evidenció presencia con intensidad mínima (+) y media (++) de saponinas, en rizomas y frondas respectivamente; la presencia de este metabolito sería el posible responsable de la supresión en la proliferación celular demostrado en este estudio (31).

También se observó presencia de alcaloides en concentraciones muy bajas en los extractos de las frondas, azúcares reductores con mayor intensidad en rizomas y presencia de lactonas sesquiterpénicas en ambos extractos. Burgos y Coello (2019), encontraron resultados muy similares a este estudio al realizar la determinación cualitativa de compuestos bioactivos en *P. pseudoaureum* (calaguala), en el extracto acuoso de rizomas encontraron resultados positivos con intensidad de tres cruces para la prueba de Fehling (aldehídos y grupos de azúcares reductores), Martin *et al.* (2019), encontraron en el extracto hidroalcohólico de frondas de *Phlebodium decumanum* (calaguala) 122 fitoconstituyentes, entre ellos encontraron derivados de amino azúcares (80). Así mismo Cruz *et al.* (2005), determinaron mediante HPLC que en las frondas de *P. decumanum* y *P. pseudoaureum* hay mayor cantidad de metabolitos que en los rizomas, estos resultados obtenidos por Cruz explicarían el por qué las

pruebas cualitativas para alcaloides y saponinas en el extracto de frondas de *N. crassifolium* (calaguala) se evidencian con mayor intensidad (81).

Por otro lado, en los extractos etanólicos de rizomas, Burgo y Coello (2019) encontraron resultados positivos con intensidad de dos cruces para la prueba de Baljet (grupos lactánicos o lactonas sesquiterpénicas), nuestros resultados también fueron positivos con intensidad de una sola cruz tanto para rizomas como para frondas (82).

Los resultados sobre la actividad inmunomoduladora de los extractos hidroalcohólicos de *N. crassifolium* (L.) Lellinger se determinaron mediante la cuantificación de la proliferación celular, la determinación del porcentaje de neutrófilos fagocíticos y la valoración de la actividad del complemento vía clásica.

El recuento linfoproliferativo se realizó mediante la adición a los pocillos con cultivos celulares la sal de tetrazolio (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica) con nombre comercial KIT-CCK8, esta sal es reducida mediante deshidrogenasas de las células activas a un producto de formazán soluble en el medio de cultivo, este producto de formazán de color naranja es directamente proporcional a la cantidad de células activas (76). Así, en este estudio se determinó la proliferación celular en los cultivos tratados con diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de frondas de calaguala, donde se observó una leve inmunomodulación negativa evidenciándose en la inhibición de la proliferación celular.

Este resultado concuerda con el estudio realizado por Brieva *et al.* (2002), donde encontraron que el extracto de las frondas de *Polipodio leuotomos*, un helecho de la familia Polipodeacea, también presentó inmunomodulación leve en el tratamiento con 200 mg/kg de peso en ratones, con un 44 % y 75% de inhibición en la producción de IL-2 (83). Alvarez (2006) encontró una acción fuertemente inhibidora (75% – 100 %) en el extracto etanólico de frondas de *P. pseudoaureum*, no siendo lo mismo para el extracto de *P. decumanum* (fronda) que evidenció acción de estimulación en la proliferación celular de linfocitos entre 30 % y 100% (84).

En nuestro estudio los tratamientos con extractos de rizoma a 1000 µg/mL y 500 µg/mL indicaron una fuerte inhibición de la proliferación celular de linfocitos T en comparación con el grupo control, como lo indica la Tabla 4. Nuestros resultados se corresponden a los resultados obtenidos por Alvarez (2006), donde el extracto del rizoma del helecho perteneciente a la familia polipodiácea *P. pseudoaureum* tuvo una actividad inmunosupresora de la proliferación de linfocitos humanos mayormente en el tratamiento con 500 µg/mL de extracto de rizomas con un porcentaje de inhibición de 55 % a 75 %. Así como hay calagualas que inhiben la proliferación celular también existen otras especies como *P. decumanun*, donde el extracto de sus rizomas tiene actividad estimuladora de la proliferación de linfocitos humanos *in vitro* en un porcentaje de 30 % a 100 % para el tratamiento con 500 ug/mL, según el estudio realizado por Alvarez (84).

Bernd *et al.* (1995), descubrieron que la Calagualina presente en el extracto acuoso de *P. leucotomos* es el metabolito responsable de la inhibición de la secreción de interleucina -2 (IL-2), además atribuyen el efecto inmunomodulador

en la proliferación de linfocitos a este metabolito (31). Gonzalez *et al.* (2000), también determinaron que hay un efecto inmunosupresor por el extracto de calaguala (*P. leucotomos*), para inhibir parcialmente la producción de citoquinas que muestran un patrón Th1 (IL-2, IFN-gamma y TNF-alfa) en células de sangre periférica humana estimulada por el mitógeno PHA (85). Rayward *et al.* (1997), encontraron resultados similares al presente estudio, ya que determinaron que el extracto de *P. leucotomos* a una concentración en el rango de 1mg/mL a 0,01 pg/mL indujo disminución significativa de blastogénesis en células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) estimuladas por el mitógeno PHA a los cinco días de cultivo (86). La inmunosupresión generada por los extractos de *N. crassifolium* explica la relativa actividad antiinflamatoria demostrada por Vargas (2022) (8).

La modulación farmacológica por plantas medicinales o sus metabolitos aislados puede activar o suprimir la fagocitosis, la desgranulación o la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Puede afectar la absorción de patógenos, cambios bioquímicos, formación de fagolisosomas y la muerte intracelular (55). Bajo estos principios se comprobó que los extractos de frondas de calaguala probados en este estudio demostraron actividad estimuladora de la fagocitosis en neutrófilos de sangre periférica humana de manera *in vitro*, a concentraciones menores a 125 µg/mL en un porcentaje de 13,97 %; siendo superior en un 11,37 % con respecto al control (sin presencia del extracto), correspondiéndose de la misma manera para levaduras totales fagocitadas con un promedio de 19,93 levaduras por cada 100 neutrófilos contados.

Los extractos de rizomas también evidenciaron una actividad fagocítica incrementada en un 17 % y 10,93 % para las concentraciones 125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 62 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente, haciendo una diferencia positiva de un 14,4 % y 8,33 % en cada tratamiento con las dos concentraciones mencionadas frente al control, resultados que concuerdan con los encontrados por Patil *et al.* (2009), donde concentraciones similares a las nuestras de 50 y 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del extracto de raíz de *Baliospermum montanum* incrementaron el número de neutrófilos fagocíticos en un promedio de 29,2 y 32,65 células (87). De la misma manera para el extracto de *Enhydra fluctuans* se determinó un incremento de neutrófilos fagocíticos en un promedio de 32,35 y 36,55 según Patil *et al.* (2008) (88). Sin embargo, en nuestro estudio esta actividad solo se vio correspondida en la cantidad de levaduras fagocitadas por cada 100 neutrófilos para la concentración de 62 $\mu\text{L}/\text{mL}$, haciendo un total de 15,87 levaduras fagocitadas en promedio. Según los resultados obtenidos, se puede concretar que la modulación de la fagocitosis en neutrófilos *in vitro* generada por los extractos de *N. crassifolium* solo sucede en concentraciones específicas, concentraciones menores a 125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para extractos de frondas y rizomas. Cabe destacar que solo la concentración de 62 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del extracto de rizomas incrementa la cantidad de levaduras fagocitadas por cada 100 neutrófilos contados. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Ghule *et al.* (2012), donde demostraron que el extracto metanólico de las partes aéreas de *Barleria prionitis* generó una mejora de la fagocitosis de *C. albicans*, con un porcentaje de actividad candidacida de 16,33 a 17,22 % en las concentraciones de 100 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (89).

En el presente estudio, las concentraciones del extracto superiores a 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no demostraron modulación de la actividad fagocítica, no obstante, Bhanwase *et*

al. (2016), determinaron que los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Ficus benghalensis* Linn genera un incremento significativo de la fagocitosis de *C. albicans* por neutrófilos humanos *in vitro* en las concentraciones de 1000 µL/mL y 500 µL/mL con un porcentaje de 45 % y 41,66 %; un promedio de 5 levaduras fagocitadas y 29 % de actividad candidacida (16). Nayak *et al* (2009) también determinó un incremento significativo ($79,25 \pm 3,75\%$) de la respuesta fagocítica de neutrófilos tratados con extractos de *Moringa citrifolia* a una concentración de 1000 µg/mL (90).

Magaji *et al.* (2020), también demostraron que a mayor concentración (1000 µg/mL) del extracto de las hojas de *Cassia occidentalis* hay un incremento de la actividad fagocítica de *C. albicans* por los neutrófilos humanos, generando un índice fagocítico de 80,2 %. Lo que se puede evidenciar en los estudios mencionados y nuestros resultados de investigación es que la actividad fagocítica está relacionada con una concentración específica de cada extracto, inclusive en algunas especies como *Barleria prionitis*, *Ficus benghalensis*, *Cassia occidentalis* y los extractos de rizomas de nuestra planta en estudio *N. crassifolium* tienen una modulación positiva de la actividad fagocítica dependiente de la concentración de los extractos de dichas plantas (17).

La inmunomodulación sobre la actividad del sistema del complemento se determinó realizando mediciones de la hemoglobina liberada al lisarse los eritrocitos de carnero sensibilizados por acción del complejo de ataque a la membrana (CAM). El tratamiento con 500 µg/mL del extracto hecho a base de frondas mostró actividad inmunomoduladora leve del sistema del complemento por la vía clásica ($p < 0,005$) evidenciándose en 44,47 g/dL de hemoglobina

liberada, un valor promedio mayor al valor del control negativo (suero inactivo); aun cuando este valor (44,47 g/dL) fue mayor al valor del suero inactivo, no superó al valor promedio del control positivo (suero activo), por lo cual se determina que hay una leve inhibición estadísticamente significativa de la actividad del complemento por la vía clásica al realizar el tratamiento con 500 µg/mL del extracto de frondas, diferencia dada frente al control negativo y las demás concentraciones del extracto.

Por otro lado, en los tratamientos realizados con el extracto de rizomas de calaguala los resultados no demostraron diferencia estadística entre tratamientos; sin embargo, al analizar los valores de los promedios de hemoglobina liberada en g/dL solo el tratamiento con 31,25 µg/mL del extracto de rizoma presentó un incremento, evidenciando un valor de 13,89 g/dL de hemoglobina más que el valor del control negativo (suero inactivo), pero sin superar el valor promedio del control positivo (suero activo). Por lo tanto, se puede evidenciar que para ambos extractos (rizomas y frondas) hay una leve inhibición de la actividad del complemento, a la concentración máxima para frondas (500 µg/mL) y en la concentración mínima (31,25 µg/mL) para rizomas. Estos resultados concuerdan con la actividad inhibitoria del sistema del complemento por la vía clásica del extracto de látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns obtenidos con metanol y acetato de etilo a una concentración de 416,5 µg/mL en un 28% y 20%, según Latansio de Oliveira *et al.* (2019) (91).

Los resultados que demuestran una leve inhibición del sistema del complemento por los extractos de calaguala en este estudio se corresponden a los encontrados por Alvares (2006), quien demostró que los extractos de rizoma y frondas de *P.*

decumanum y *P. pseudoaureum* evaluados presentaron actividad inhibitoria sobre la vía clásica del sistema de complemento, presentando el extracto de rizoma de *P. decumanum* una CI50 de 2.37 µg/mL y frondas de la misma planta 5.50 µg/mL; las frondas de *P. pseudoaureum* una CI50 de 13.76 µg/mL y rizomas 13.84 µg/mL (84). En otros estudios realizados, los extractos de *Pimenta dioica*, *Piper auritum*, *Justicia pectoralis* y *Cissampelos tropaeolifolia* no presentaron ninguna actividad sobre el sistema de complemento, pero *Ternstroemian tepezapote* y *Lippia chiapasensis* presentaron actividad inhibitoria de la vía clásica del sistema del complemento, resultado que concuerda con este estudio (18). Chan *et al.* (1999) atribuyen como sustancias activadoras del complemento a compuestos vegetales grandes mayores a 400 kDa que contienen polifenoles en extractos de tabaco. Inngjerdingen *et al.* (2005) atribuye esta actividad a polisacáridos de tipo pectina que contienen azúcares como ramnosa, galactosa y arabinosa en *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC. (92,93).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se logró determinar cualitativamente compuestos bioactivos como saponinas, lactonas sesquiterpénicas y azúcares reductores presentes en ambos extractos de *N. crassifolium* (L.) Lellinger, con presencia de alcaloides solo en el extracto de frondas.
- Se evaluó la capacidad linfoproliferativa del extracto hidroalcohólico de *N. crassifolium* (L.) Lellinger, encontrando actividad fuertemente inhibitoria de la proliferación de linfocitos *in vitro* para los extractos de rizomas a 1000 y 500 µg/mL, pero muy leve para los extractos de frondas.
- Se determinó el efecto inmunomodulador del extracto de *N. crassifolium* (L.) Lellinger sobre la actividad fagocítica de neutrófilos y el número de levaduras *C. albicans* fagocitadas, encontrando un incremento de la respuesta fagocítica a concentraciones específicas menores a 125 µg/mL, correspondiéndose con el aumento en el número de levaduras fagocitadas por neutrófilos en las mismas concentraciones para extractos de frondas y solo en la concentración de 62 µg/mL para el extracto de rizomas.
- Se logró determinar la capacidad inmunomoduladora del extracto hidroalcohólico de *N. crassifolium* (L.) Lellinger sobre la actividad del sistema del complemento vía clásica evidenciado mediante hemólisis y recuento de hemoglobina liberada de eritrocitos sensibilizados, donde se encontró un efecto inhibitorio leve en las concentraciones de 500 µg/mL y 31,25 µg/mL del extracto de rizomas y frondas respectivamente.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda la continuidad del trabajo para determinar con métodos de mayor precisión los metabolitos bioactivos presentes en los extractos hidroalcohólicos de la planta en estudio, en función del mejor conocimiento referente a los agentes inmunomoduladores presentes en *N. crassifolium*, y de los cuales se conozca su mecanismo de acción.

Se recomienda realizar más investigaciones relacionados a este tema de investigación utilizando nuevas tecnologías de alta precisión existentes en el campo de la inmunología, para conocer los mecanismos o receptores específicos que realiza la mejora o la supresión de la actividad inmunomoduladora del extracto de *N. crassifolium* sobre células del sistema inmune, incluyendo estudios in vivo en animales de experimentación.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Kılıç CS. Herbal coumarins in healthcare. En: Herbal Biomolecules in Healthcare Applications. Elsevier; 2022. p. 363–80.
2. Béjar E. Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (dc.) A. Gray “matico serrano” en un modelo de daño gástrico en ratas inducido por etanol 70%. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016.
3. Chabannes M, Bordereau P, Martins PV, Dragon-Durey MA. Sheep Erythrocyte Preparation for Hemolytic Tests Exploring Complement Functional Activities. En 2021 [citado 12 de diciembre de 2023]. p. 61–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33847931/>
4. Fisher Scientific. Thermo ScientificTM Fitohemaglutinina (PHA) purificada [Internet]. 2023 [citado 12 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.fishersci.es/shop/products/remel-pha-purified/10082333>
5. Alvarenga N, Burgos C, Villalba I, Giménez V, Carpinelli MM, Sotelo PH, et al. Extractos vegetales de tres especies del género *Baccharis* inducen la proliferación de células mononucleares humanas. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. 12 de agosto de 2018;16(2):12–20.
6. Castillo A, Cabrera N, Linares Y. Plantas medicinales & sistema inmune [Internet]. Cuba; 2021 [citado 28 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://cibamanz2021.sld.cu/index.php/cibamanz/cibamanz2021/paper/viewFile/781/500>
7. Ruiz C. Conocimientos Tradicionales Plantas Medicinales de Cajamarca [Internet]. Cajamarca; 2012 [citado 18 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://repositoriodigital.minam.gob.pe/bitstream/handle/123456789/182/BIV01236.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
8. Vargas C. Identificación de metabolitos secundarios y evaluación del efecto antiinflamatorio y cicatrizante del extracto etanólico de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lessinger “Calaguala” [Internet]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2022 [citado 19 de agosto de 2023]. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/18629/Vargas_c.pdf?sequence=3
9. Shi J, Weng JH, Mitchison TJ. Immunomodulatory drug discovery from herbal medicines: Insights from organ-specific activity and xenobiotic defenses. Elife [Internet]. 1 de noviembre de 2021 [citado 18 de agosto de 2023];10. Disponible en: [/pmc/articles/PMC8592567/](https://pmc/articles/PMC8592567/)
10. Lin L, Luo L, Zhong M, Xie T, Liu Y, Li H, et al. Gut microbiota: a new angle for traditional herbal medicine research. RSC Adv [Internet]. 5 de mayo de 2019 [citado 18 de agosto de 2023];9(30):17457. Disponible en: [/pmc/articles/PMC9064575/](https://pmc/articles/PMC9064575/)

11. Van der Zanden SY, Luimstra JJ, Neefjes J, Borst J, Ovaa H. Opportunities for Small Molecules in Cancer Immunotherapy. Trends Immunol [Internet]. 1 de junio de 2020 [citado 18 de agosto de 2023];41(6):493–511. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32381382/>
12. Alhazmi HA, Najmi A, Javed SA, Sultana S, Al Bratty M, Makeen HA, et al. Medicinal Plants and Isolated Molecules Demonstrating Immunomodulation Activity as Potential Alternative Therapies for Viral Diseases Including COVID-19. Front Immunol [Internet]. 13 de mayo de 2021 [citado 18 de agosto de 2023];12:1. Disponible en: </pmc/articles/PMC8155592/>
13. Condori EM, Costa SS, Herrera-Calderon O. Medicinal Plants in Peru as a Source of Immunomodulatory Drugs Potentially Useful Against COVID-19. Rev Bras Farmacogn [Internet]. 1 de abril de 2023 [citado 18 de agosto de 2023];33(2):237–58. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36855527/>
14. Perejón IR, García MD. Plantas medicinales que actúan sobre el sistema inmune. Ars Pharm. 2022;63:92–105.
15. Haria EN, Perera MADN, Senchina DS. Immunomodulatory effects of *Echinacea laevigata* ethanol tinctures produced from different organs. Bioscience Horizons. 2016;9.
16. Bhanwase A, Alagawadi K. Antioxidant and Immunomodulatory Activity of Hydroalcoholic Extract and its Fractions of Leaves of *Ficus benghalensis* Linn. Pharmacognosy Res [Internet]. 1 de enero de 2016 [citado 18 de agosto de 2023];8(1):50. Disponible en: </pmc/articles/PMC4753760/>
17. Magaji K, Abdullahi S, Umar M, Yakubu A, Garba Y, Francis N, et al. Immunostimulatory activity of aqueous leaf extract of *Cassia occidentalis* on human neutrophils. Int J Herb Med. 2020;8(1).
18. Lemus LF. Inmunomodulación de las vías clásica y alterna del sistema de complemento por seis plantas medicinales de Guatemala [Internet]. [Guatemala]; 2007 [citado 19 de agosto de 2023]. Disponible en: file:///C:/Users/ADMIN/Downloads/inmunomodulacion-de-las-vias-clasica-y-alterna-del-sistema-de-c_F9CWVar.pdf
19. Condori W. Evaluación del efecto antiinflamatorio tópico del extracto y gel de *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) en edema plantar inducido en animales de experimentación [Internet]. 2013 [citado 19 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12920/4400/65.1495.FB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
20. G. Bhat S. Medicinal Plants and Its Pharmacological Values. En: Natural Medicinal Plants. IntechOpen; 2022.
21. Nasim N, Sandeep IS, Mohanty S. Plant-derived natural products for drug discovery: current approaches and prospects. The Nucleus. 18 de diciembre de 2022;65(3):399–411.

22. Zebeaman M, Tadesse MG, Bachheti RK, Bachheti A, Gebeyhu R, Chaubey KK. Plants and Plant-Derived Molecules as Natural Immunomodulators. *Biomed Res Int.* 5 de junio de 2023;2023:1–14.
23. Organización Mundial de la Salud. La resistencia a los antimicrobianos, acelerada por la pandemia de COVID-19 [Internet]. 2021 [citado 27 de diciembre de 2023]. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55928/OPSCDEAMRCOVID19220006_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
24. Universidad Nacional Autónoma de México. *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger [Internet]. 2018 [citado 8 de enero de 2024]. Disponible en: <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:841373>
25. Royal Botanic Gardens. *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger [Internet]. 2018 [citado 8 de enero de 2024]. Disponible en: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:170054-2>
26. Castro A, Davila C, Laura W, Cubas F, Avalos G, López C, et al. Climas del Perú- Mapa de Clasificación Climática Nacional. Lima; 2021.
27. Reyes E, Jaén P, Heras ED Las, Eusebio E De, Carrión F, Cuevas J, et al. Systemic immunomodulatory effects of *Polypodium leucotomos* as an adjuvant to PUVA therapy in generalized vitiligo: A pilot study. *J Dermatol Sci* [Internet]. 1 de marzo de 2006 [citado 4 de septiembre de 2023];41(3):213–6. Disponible en: <http://www.jdsjournal.com/article/S0923181105003452/fulltext>
28. Tuominen M, Bohlin L, Rolfsen W. Effects of Calaguala and an Active Principle, Adenosine, on Platelet Activating Factor. *Planta Med.* 5 de agosto de 1992;58(04):306–10.
29. Ramírez A, Zapaterb P, Betllochc I, Alberod F, Martineza A, Díaz J, et al. Extracto de *Polypodium leucotomos* en dermatitis atópica: ensayo multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo. 2012;103(7):599–607.
30. Brieva A, Guerrero A, Pivel JP. Immunomodulatory properties of a hydrophilic extract of *Polypodium leucotomos*. *Inflammopharmacology.* agosto de 2001;9(4):361–71.
31. Bernd A, Ramirez-Bosca A, Huber H, Diaz Alperi J, Thaci D, Sewell A, et al. In vitro studies on the immunomodulating effects of *Polypodium leucotomos* extract on human leukocyte fractions. *Arzneimittelforschung* [Internet]. agosto de 1995 [citado 25 de noviembre de 2023];45(8):901–4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7575758/>
32. Aldana F. Detección y cuantificación de flavonoides en *Polypodium triseriale* Swartz, *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. y *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger; tres especies de calahuala nativas de Guatemala. [Guatemala]: Universidad de San Carlos de Guatemala ; 2007.

33. Jara N, Villarroel E. Actividad diurética del extracto hidroalcohólico de los rizomas de calaguala (*Polypodium picnocarpum*) en ratas albinas. [Lima]: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019.
34. Cabanillas Y, Chávez L. Determinación preliminar de fitoconstituyentes en rizomas de *Niphidium albopunctatissim* Lellinger y su actividad frente al radical libre 2,2-difenil- picrilhidrazilo. [Trujillo]: Universidad Nacional de Trujillo; 2018.
35. Budisan L, Gulei D, Zanoaga OM, Irimie AI, Sergiu C, Braicu C, et al. Dietary Intervention by Phytochemicals and Their Role in Modulating Coding and Non-Coding Genes in Cancer. *Int J Mol Sci.* 1 de junio de 2017;18(6).
36. Harun NH, Septama AW, Ahmad W, Suppian R. Immunomodulatory effects and structure-activity relationship of botanical pentacyclic triterpenes: A review. *Chin Herb Med.* abril de 2020;12(2):118–24.
37. Pop S, Enciu AM, Tarcomnicu I, Gille E, Tanase C. Phytochemicals in cancer prevention: modulating epigenetic alterations of DNA methylation. *Phytochemistry Reviews.* 10 de agosto de 2019;18(4):1005–24.
38. Gonzalez J, Pradas F, Molina ES, de Teresa C. Effect of *Phlebodium decumanum* on the immune response induced by training in sedentary university students. *J Sports Sci Med.* 2011;10(2):315–21.
39. Polini A, del Mercato L, Barra A, Zhang Y, Calabi F, Gigli G. Towards the development of human immune-system-on-a-chip platforms [Internet]. Vol. 24, *Drug Discovery Today.* Elsevier Ltd; 2019 [citado 25 de agosto de 2023]. p. 517–25. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644618301582?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=7fb8add8deb61ea8
40. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP. KUBY. *Inmunología.* 7ª ed. McGraw Hill, editor. México; 2016.
41. Guillamon E. Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. *Ars Pharmaceutica (Internet).* 14 de septiembre de 2018;59(3).
42. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Inmunología de Kuby.* 6ª ed. León J, editor. México; 2007.
43. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Inmunobiology.* 5ª ed. Garland Science, editor. Nueva York; 2001.
44. Rosales C, Demarex N, Lowell CA, Uribe-Querol E. Editorial Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. 2016 [citado 26 de agosto de 2023]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1469780>
45. Bonilla Z. Efecto de los antioxidantes y la fagocitosis bacteriana sobre la apoptosis de los neutrófilos. [Oviedo]: Universidad de Oviedo; 2013.

46. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. Inmunología de los trasplantes. INMUNOLOGIA de Kuby. 2007. 424–446 p.
47. Chávez F, Rojas M, Fortoul T, Tenorio E. Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad. Rev Fac Med (Méx) [Internet]. 2017 [citado 28 de febrero de 2024]; Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422017000500036&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2448-4865.
48. Parra-Ortega I, Salceda-Rangel KS, Nájera-Martínez N, López-Martínez B, Ortiz-Navarrete V, Olvera-Gómez I. Determinación y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T y células natural killer en sangre periférica de individuos sanos por citometría de flujo. Bol Med Hosp Infant Mex [Internet]. 1 de marzo de 2019 [citado 26 de agosto de 2023];76(2):66–78. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v76n2/1665-1146-bmim-76-02-66.pdf>
49. Carvalho E, Oliveira W, Coelho L, Correia M. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. Life Sci. agosto de 2018;207:152–7.
50. Lomonte B. Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica [Internet]. Costa Rica; 2009 [citado 7 de septiembre de 2023]. Disponible en: http://www.medic.ula.ve/idic/docs/clases/iahula/curso_2010/suplementario-tema16.pdf
51. Instituto Nacional del Cáncer. Instituto Nacional del Cáncer, PMN [Internet]. 2023 [citado 26 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/pmn>
52. Pérez A. El macrófago y sus principales características [Internet]. 2017 [citado 26 de agosto de 2023]. Disponible en: <http://cardiolatina.com/wp-content/uploads/2017/05/El-macr%3F%3Ffago-y-sus-principales-caracter%3F%3Fsticas.pdf>
53. Deshpande O, Wadhwa R. StatPearls. 2023 [citado 28 de febrero de 2024]. Phagocytosis. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556043/>
54. Jantan I, Ahmad W, Kumolosasi E, Bukhari SNA. Immunostimulatory effects of the standardized extract of *Tinospora crispa* on innate immune responses in Wistar Kyoto rats. Drug Des Devel Ther. junio de 2015;2961.
55. Gierlikowska B, Stachura A, Gierlikowski W, Demkow U. Phagocytosis, Degranulation and Extracellular Traps Release by Neutrophils—The Current Knowledge, Pharmacological Modulation and Future Prospects. Front Pharmacol. 4 de mayo de 2021;12.
56. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. Cell Res. 15 de enero de 2010;20(1):34–50.

57. Lintner KE, Wu YL, Yang Y, Spencer CH, Hauptmann G, Hebert LA, et al. Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 15 de febrero de 2016;7.
58. Nesargikar P, Spiller B, Chavez R. The complement system: History, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* junio de 2012;2(2):103–11.
59. Rosés RP. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de biomoléculas de origen vegetal. 2015.
60. Gea-Banacloche JC. Immunomodulation. En: *Principles of Molecular Medicine.* Totowa, NJ: Humana Press; p. 893–904.
61. Krishna H, Janakiram T, Singh MK, Karuppaiah V, Yadava RB, Prasad RN, et al. Immunomodulatory potential of vegetables vis-à-vis human health. *J Hortic Sci Biotechnol.* 3 de septiembre de 2022;97(5):560–79.
62. Ajaya Kumar R, Sridevi K, Vijaya Kumar N, Nanduri S, Rajagopal S. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J Ethnopharmacol.* junio de 2004;92(2–3):291–5.
63. Jantan I, Ahmad W, Bukhari SNA. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Front Plant Sci.* 25 de agosto de 2015;6.
64. Morris H, Martínez C, Abdala R, Campos D. Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Invest Bioméd.* agosto de 1999;2.
65. Di Sotto A, Vitalone A, Di Giacomo S. Plant-derived nutraceuticals and immune system modulation: An evidence-based overview. *Vaccines (Basel)* [Internet]. 1 de septiembre de 2020 [citado 28 de agosto de 2023];8(3):1–34. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-393X/8/3/468>
66. Aranda-Cuevas B, Tamayo-Cortez J, Vargas L, Islas-Flores I, Arana-Argáez V, Solís-Pereira S, et al. Assessment of the immunomodulatory effect of *Aloe vera* polysaccharides extracts on macrophages functions. *Emir J Food Agric* [Internet]. 14 de mayo de 2020 [citado 31 de agosto de 2023];32(6):408–16. Disponible en: <https://ejfa.me/index.php/journal/article/view/2101>
67. Kim SH, Shim KS, Song Y, Kim K, Park CS, Lee CK. Pharmacological and Therapeutic Activities of *Aloe vera* and Its Major Active Constituent Acemannan. *Food Supplements and Biomaterials for Health.* 2023;3(2).
68. Carretero M HT. Equináceas en aparato respiratorio. Situación actual. 2018;42:619–23.
69. Nagoor MF, Javed H, Sharma C, Goyal SN, Kumar S, Jha NK, et al. Can Echinacea be a potential candidate to target immunity, inflammation, and infection - The trinity of coronavirus disease 2019. *Heliyon* [Internet]. 1 de febrero de 2021 [citado 1 de septiembre de 2023];7(2):e05990. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S2405844021000955/fulltext>

70. Attard E, Cuschieri A. In vitro immunomodulatory activity of various extracts of Maltese plants from the Asteraceae family. *J Med Plant Res.* 2009;3:1–457.
71. Acosta L. Desinfección de plantas medicinales - principios básicos. 2002.
72. Carballo C, Alfaro T, Pzón Z, Ramos R, Rodríguez C, Cabezas C, et al. Desinfección química de plantas medicinales II. *Plantago lanceolata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* [Internet]. 2002 [citado 7 de septiembre de 2023];7. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962002000300003
73. García RU, Cruz F, Alarcón FJ, Nieto A, Gallegos ME. Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* Banks ex König et Sims de la localidad de Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017. *Polibotanica.* 1 de julio de 2019;0(48).
74. Amirghofran Z, Hashemzadeh R, Javidnia K, Golmoghaddam H, Esmailbeig A. In vitro immunomodulatory effects of extracts from three plants of the Labiatae family and isolation of the active compound(s). *J Immunotoxicol.* 28 de diciembre de 2011;8(4):265–73.
75. Seeligmüller N. Aislamiento más rápido de PBMC usando Ficoll-Paque® Plus en las centrifugas de sobremesa multiusos 5920 R y 5910 Ri Eppendorf [Internet]. Madrid; 2021 [citado 7 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/es/169514/Eppendorf_Centrifugation_Application-Note_372_Centrifuge-5920-R_Centrifuge-5910-R_Faster-Isolation-PBMC-Ficoll-Paque-Plus-Eppendorf-Multipurpose-Benchtop-Centrifuges-5920-R-5910-R.pdf
76. Sigma - Aldrich. 96992 Cell Counting Kit - 8 [Internet]. 2018 [citado 28 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/381/017/96992dat.pdf>
77. Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P. Effect of *Semecarpus anacardium* Linn. nut milk extract on rat neutrophil functions in adjuvant arthritis. *Cell Biochem Funct.* julio de 2006;24(4):333–40.
78. Gabhe S, Tatke P, Khan T. Evaluation of the immunomodulatory activity of the methanol extract of *Ficus benghalensis* roots in rats. *Indian J Pharmacol.* 2006;38(4):271.
79. Pichardo NI, Teo AY. “Actividad Inmunomoduladora de Especies Cultivadas Nativas de Mesoamérica” (*P. alliacea* L y *S. domingensis* Willd). [Guatemala]: Universidad San Carlos de Guatemala; 2010.
80. Martín-Pozo L, Zafra-Gómez A, Cantarero-Malagón S, Vilchez JL. Analysis of *Phlebodium decumanum* Fronds by High-Performance Liquid Chromatography by Ultraviolet-Visible and Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry

- (HPLC–UV–VIS–QTOF–MS/MS). *Anal Lett.* 2 de septiembre de 2019;52(13):2107–32.
81. Cruz S, Solis N, Solis P, Gupta M, Cáceres A. Caracterización fitoquímica de extractos de frondas y rizomas de dos especies del género *Phlebodium* provenientes de Honduras y Guatemala. 2005 [citado 1 de noviembre de 2023]; Disponible en: <https://rcientifica.com/index.php/revista/article/view/201/279>
 82. Burgos O, Coello M. Estudio farmacognóstico, fitoquímico, y microbiológico del *Phlebodium pseudoaureum* (calaguala). [Internet]. [Guayaquil]: Universidad de Guayaquil; 2019 [citado 1 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://docplayer.es/131053775-Universidad-de-guayaquil-facultad-de-ciencias-quimicas-proyecto-de-titulacion-previo-al-titulo-de-quimico-y-farmaceutico.html>
 83. Brieva A, Guerrero A, Pivel JP. Immunomodulatory properties of a hydrophilic extract of *Polypodium leucotomos*. *Inflammopharmacology.* agosto de 2001;9(4):361–71.
 84. Alvarez E. Actividad Inmunomoduladora de rizomas y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *Phlebodium decumanum* [Internet]. [Guatemala]: Universidad de San Carlos de Guatemala ; 2006 [citado 2 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/08/911588/actividad-inmunomoduladora-de-rizomas-y-frondas-de-phlebodium-p_Wjijb0g.pdf
 85. Gonzalez S, Alcaraz M V, Cuevas J, Perez M, Jaen P, Alvarez-Mon M, et al. An extract of the fern *Polypodium leucotomos* (Difur) modulates Th1/Th2 cytokines balance in vitro and appears to exhibit anti-angiogenic activities in vivo: pathogenic relationships and therapeutic implications. *Anticancer Res.* 2000;20(3A):1567–75.
 86. Rayward J, Villarrubia VG, Guillen C, Prieto A, Rodriguez-Zapata M, Sada G, et al. An extract of the fern *Polypodium leucotomos* inhibits human peripheral blood mononuclear cells proliferation in vitro. *Int J Immunopharmacol.* enero de 1997;19(1):9–14.
 87. Patil K, Jalalpure S, Wadekar R. Effect of *Baliospermum montanum* Root Extract on Phagocytosis by Human Neutrophils. *Indian J Pharm Sci.* 2009;71(1):68.
 88. Patil K, Wadekar R. Effect of *Enhydra fluctuans* Lour. Leaf Extract on Phagocytosis by Human Neutrophils. 2008 [citado 20 de enero de 2024]; Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/294741256_Effect_of_Enhydra_fluctuans_Lour_Leaf_Extract_on_Phagocytosis_by_Human_Neutrophils
 89. Ghule BV, Yeole PG. In vitro and in vivo immunomodulatory activities of iridoids fraction from *Barleria prionitis* Linn. *J Ethnopharmacol.* mayo de 2012;141(1):424–31.
 90. Nayak S, Mengi S. Immunostimulant activity of the extracts and bioactives of the fruits of *Morinda citrifolia*. *Pharm Biol.* marzo de 2009;47(3):248–54.

91. Latansio de Oliveira T, Fontana P, Bavia L, Cruz L, Crisma A, Sasaki G, et al. Effects of *Euphorbia umbellata* extracts on complement activation and chemotaxis of neutrophils. *J Ethnopharmacol.* enero de 2021;265:113348.
92. Inngjerdingen KT, Debes SC, Inngjerdingen M, Hokputsa S, Harding SE, Rolstad B, et al. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *J Ethnopharmacol.* octubre de 2005;101(1–3):204–14.
93. Chan WS, Chowdhry S, Chang T, Kew RR. Initial Characterization of the Complement Activating Compounds in Extracts of Smokeless Tobacco. *Immunobiology.* septiembre de 1999;201(1):64–73.

APÉNDICES

Apéndice 1. Vista panorámica de la zona de muestreo del material vegetal.



Apéndice 2. Plantas de *Niphidium crassifolium* (L) Lellinger (calaguala).

	
<p>1. Planta de calaguala en su hábitat natural.</p>	<p>2. Frondas y rizomas extraídos de su hábitat.</p>

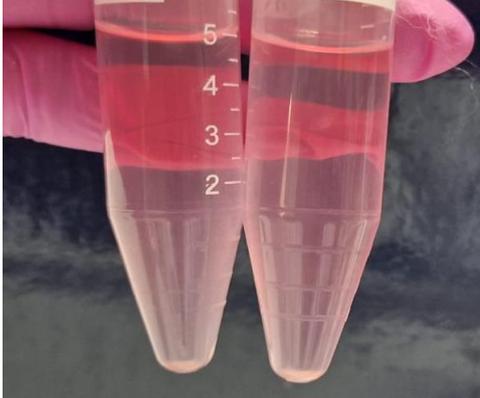
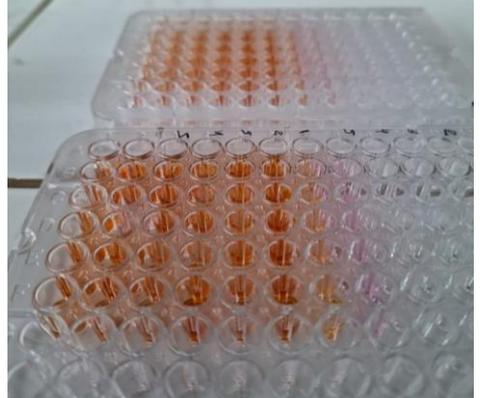
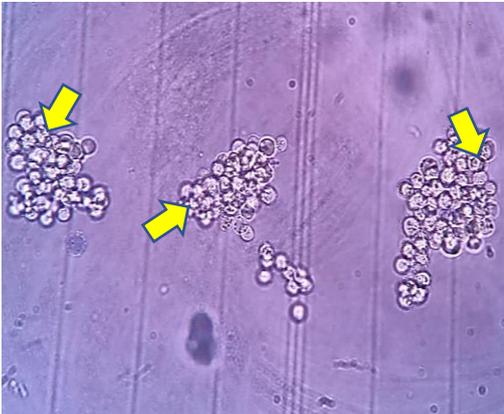
Apéndice 3. Procesamiento de muestras de rizomas y frondas de calaguala para obtención del extracto hidroalcohólico.

	
<p>1. Rizomas de calaguala en proceso de deshidratación.</p>	<p>2. Frondas de calaguala en proceso de deshidratación.</p>
	
<p>3. Muestra de frondas pulverizada.</p>	<p>4. Macerado de las muestras de frondas y rizomas.</p>
	
<p>5. Filtrado del extracto.</p>	<p>6. Obtención del extracto seco.</p>

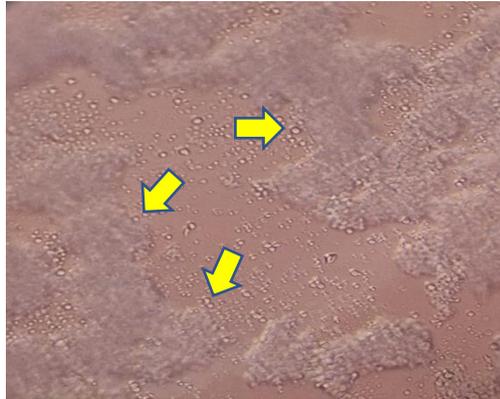
Apéndice 4. Diferentes pruebas cualitativas que determinaron la presencia y ausencia de metabolitos bioactivos en los extractos de frondas y rizomas de calaguala.

Método de prueba	Extracto de frondas	Extracto de rizomas
Prueba de Wagner		
Prueba de Baljet		
Ensayo de Fehling		
Prueba de la espuma		

Apéndice 5. Proceso de obtención de células mononucleares de sangre periférica y proliferación celular de linfocitos.

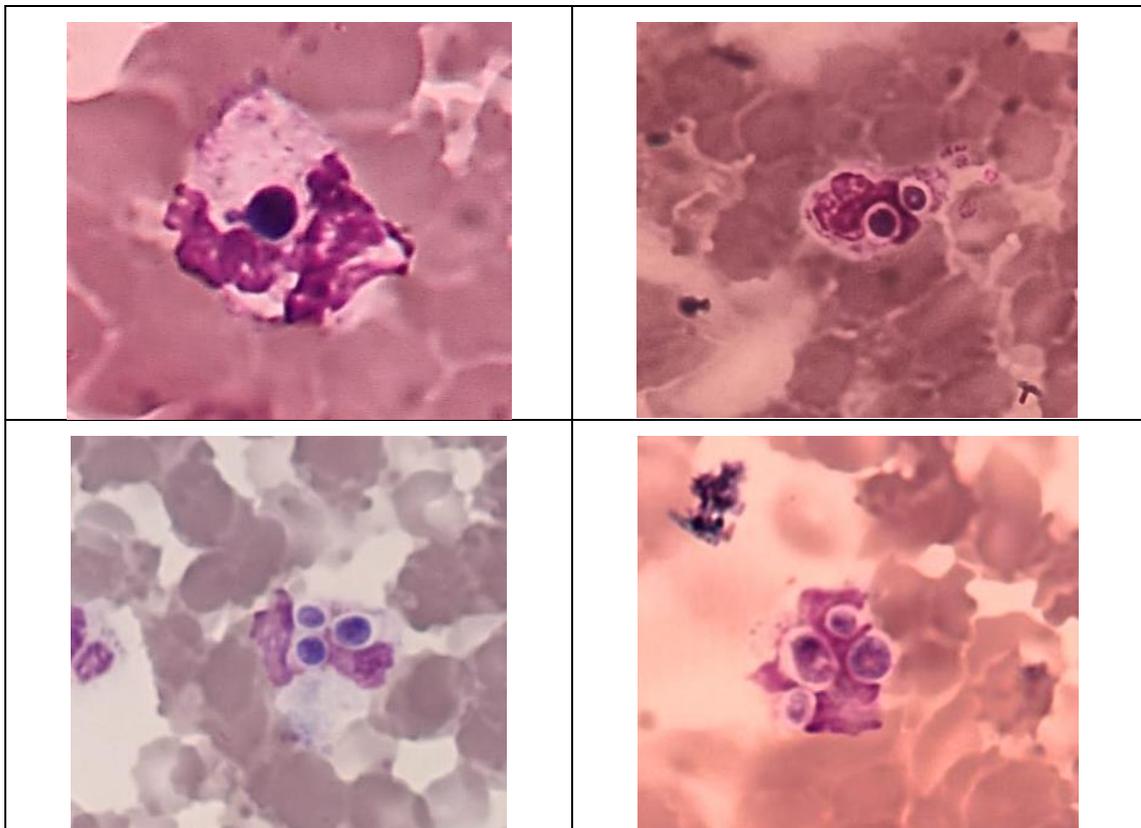
	
<p>1. obtención de muestra de sangre en tubos con heparina de litio.</p>	<p>2. Separación de células mononucleares (anillo de la interfaz entre plasma y medio histopaque).</p>
	
<p>3. Aislamiento de células mononucleares (botón celular en el fondo del tubo).</p>	<p>4. Cultivos celulares en medio RPMI, producción de formazán de color naranja.</p>
	

5 y 6. Proliferación de linfocitos luego de la incubación en condiciones estándar, observación microscópica a 40 X en cámara newbauer. Las flechas amarillas señalan células linfocíticas, algunas células formando racimos al agruparse.



7. Observación de cultivos celulares en pocillos de la placa ELISA mediante microscopio con objetivo invertido a 10 X, como se indica con las flechas amarillas.

Apéndice 6. Observación microscópica (100X) de neutrófilos humanos haciendo fagocitosis de *C. albicans*, las células fagocitadas se observan de un color morado diferente al color de los núcleos de neutrófilos, algunas levaduras con un halo transparente.



Apéndice 7. Visualización de la hemólisis de eritrocitos de carnero luego del tratamiento con los extractos de calaguala, sedimentación de eritrocitos no lisados (A).



Apéndice 8. Consentimiento informado para participación de seres humanos en el estudio de investigación, formato correspondiente al nivel de riesgo mínimo.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

Av. Atahualpa 1050 -CAJAMARCA

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

-
ADULTOS
-

Institución : Universidad Nacional de Cajamarca - UNC

Investigadores : Portal Huaccha María Elvira
Marco Antonio Rivera Jacinto
JéssicaNathalie Bardales Valdivia

Título : Actividad inmunomoduladora *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Niphidium crassifolium* “calaguala” sobre células del sistema inmune.

¿De qué se trata el estudio?

El estudio denominado “Actividad inmunomoduladora *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Niphidium crassifolium* “Calaguala” sobre células del sistema inmune” será desarrollado por investigadores de la Universidad Nacional de Cajamarca, a fin de determinar si la calaguala tiene actividad

inmunomoduladora, es decir, que mejora o suprime la respuesta inmunológica de un individuo; sin embargo, este trabajo sólo lo realizaremos en condiciones “*in vitro*”, para lo cual requerimos coleccionar muestras sanguíneas humanas con las que se realizarán los ensayos.

La información de este estudio será de mucha importancia y servirá para mejorar el conocimiento de las propiedades de este vegetal. La “calaguala” es un helecho que se utiliza en la medicina tradicional cajamarquina, como antiinflamatorio, para el tratamiento de gastritis, heridas, hematomas y hepáticas; sin embargo, es necesario estudios experimentales enfocados a demostrar la utilidad de este vegetal.

¿Cómo voy a participar?

Si usted acepta participar en este estudio, y tiene entre 18 y 35 años de edad, y no se ha medicado en los últimos 15 días, le pediremos que firme este formato de consentimiento informado por duplicado, y le entregaremos una copia. Su participación consistirá en lo siguiente:

Se harán dos reuniones:

Primera reunión: en la Universidad

- Se explicará el motivo del estudio.
- Se explicará los riesgos de su participación.
- Se absolverá las preguntas que usted quiera hacer.

Segunda reunión: en la Universidad

- Se citará al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca, en donde un especialista de laboratorio le extraerá una muestra de 10 mL de sangre del antebrazo para realizar el experimento *in vitro*.
- Los costos del traslado serán cubiertos por el estudio y no le ocasionarán gasto alguno.

¿Existen riesgos para usted al participar en el estudio?

No se prevén riesgos para usted por participar en esta fase del estudio, ya que el estudio es en las células sanguíneas y no directamente en su persona.

La toma de muestra de sangre del antebrazo es ligeramente dolorosa, y le puede ocasionar un pequeño hematoma (moretón) el cual desaparecerá en un tiempo aproximado de tres a cinco días.

¿Cómo se beneficia usted si decide participar?

No existe un beneficio directo para usted. Los beneficios del estudio serán para toda la población, ya que, el conocimiento de las propiedades de este vegetal a través de la experimentación científica logrará un mejor aprovechamiento de esta planta.

¿Tendré algún beneficio económico por participar en el estudio?

Usted NO recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole, únicamente la satisfacción de participar para lograr un mejor conocimiento de las propiedades de esta planta propia de nuestra región.

¿Quién va a saber que estamos participando en el estudio?

Nosotros guardaremos la información de usted con códigos y no con nombres. Si los resultados de este estudio son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas que participan en este estudio. Los archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio.

¿Me puedo retirar en cualquier momento?

Si usted decide participar, y luego cambia de opinión, puede retirarse de éste en cualquier momento.

¿A quién llamo si quiero hacer preguntas sobre el estudio?

Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte a los responsables del estudio, Dr. Marco Rivera Jacinto al teléfono 976996558, Dr. Jéssica Bardales Valdivia 943639963, tesista María Elvira Portal Huaccha 937378013.

Si tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio y sus derechos como participante, puede contactar al Comité Institucional de Ética en Investigación de la

UNC.

CONSENTIMIENTO

Después de haber comprendido la información proporcionada y que he tenido la oportunidad de formular mis preguntas y dudas, las que han sido contestadas y aclaradas, acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo que no hay mayor riesgo ni peligro que pueda pasar si participo en el proyecto. Recibiré una copia firmada de este consentimiento.

Para constancia de lo expuesto con anterioridad firmamos este documento a los _____ días del mes de _____ del año _____.

Participante

Nombre:

DNI:

Investigador

Nombre:

DNI:

Testigo (Si el participante es
iletrado)Nombre:
DNI: