

LA UNCARIA TOMENTOSA WILL DC (UÑA DE GATO) AUMENTA LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO EN RATONES CON ENDOTOXEMIA POR LIPOPOLISACARIDO

Pedro Angulo Herrera, Liz Fabiola Vergara Almonacid; Angel Rodríguez Huertas; Julio Miguel Oscanoa Lagunas

Laboratorio de Investigación y Desarrollo "Alicia Darg Barbieri" del Colegio Químico Farmacéutico del Perú

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar el efecto del extracto acuoso de las hojas y corteza de la *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato) en ratones albinos con endotoxemia inducida por lipopolisacárido (LPS). Nuestros resultados indican que tanto las hojas como la corteza aumentan significativamente la producción de óxido nítrico (NO) en este modelo experimental; sin embargo, la corteza presenta la mayor actividad.

ABSTRACT

The aim of this research was to assess the water extract effect of the leaves and bark of the *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw) in albino mice with endotoxemia induced by lipopolisacárido (LPS). Our results indicate that both the leaves and the bark increase significantly the production of nitric oxide (NO) in this experimental model; nevertheless, the bark presents the major activity.

La *Uncaria tomentosa*, conocida comúnmente como Uña de Gato (UG) es una de las plantas más conocidas de nuestro país y crece en forma silvestre en la región amazónica del Perú. Su propiedad antiinflamatoria e inmunoestimulante han merecido una gran atención de la comunidad científica mundial, aunque farmacológicamente se trata de dos procesos diferentes. Wagner *et al.*, (1) de la Universidad de Munich fueron los primeros en demostrar la potente acción inmunoestimulante de la corteza de la UG, por medio de la prueba de luminiscencia observaron *in vitro* que los alcaloides indólicos isopteropodina, pteropodina, isomitrafalina y isorinochofilina potenciaron la fagocitosis de las partículas de carbón por los macrófagos. Esta propiedad ha sido patentado por Keplinger *et al.*, (2, 3) y ya están disponibles algunos productos comerciales. En 1995, wagner (4) reportó que el extracto de la UG presentó el efecto inmunoestimulante más potente entre las especies ensayadas en su laboratorio. Por su parte Lemaire *et al.*, (5) con el propósito de obtener un mejor entendimiento del efecto de la UG sobre el sistema inmune, estudiaron el efecto *in vitro* de extractos acuosos de la corteza de UG; sus resultados sugieren una fuerte acción inmunoestimulante de la UG.

Klymenko y Zaziba (6) del Centro de Investigación Médica de Radiación de la Academia de Ciencias Médicas de Ucrania, han estudiado el efecto de la UG en pacientes como consecuencia de la catástrofe de la Central Atómica de Chernovyl; sus resultados fueron bastante alentadores, pues los títulos de anticuerpos, la población y subpoblación celular de los linfocitos T y B se incrementaron en los pacientes con inmunodeficiencia hasta niveles próximos a las personas sanas. Ruiz Urbina⁺ (7) realizó estudios en perros y gatos; administró cápsulas de corteza de UG liofilado a perros y gatos geriátricos con osteoartritis, estos manifestaron un pronto alivio al dolor y observó que el pelaje presentó un mejor aspecto. Además, gatas con tumor mamario que eran tratados con cirugía sobrevivieron sólo el 8% hasta por un año; mientras que las tratadas con UG sobrevivieron por más de un año y perros con enteritis viral debido a parvovirus, tratados con la UG respondieron más eficientemente a la medicación específica (7).

Recientemente, Soto Requena (8) ha iniciado un estudio interesante sobre la UG; se propone determinar el efecto inmunoestimulante de la UG en aves (pollos de carne) inmunodeprimidos y comparar este efecto con el levamisol; mientras que, Angulo y col vienen ensayando el efecto de las hojas de UG en la adaptación al estrés medioambiental en pollos de carne.

La presentación de nuevos datos experimentales de plantas medicinales que crecen en nuestro país, contribuyen al mejor conocimiento científico y uso racional de las mismas. Por eso nos propusimos como objetivo determinar el efecto del extracto acuoso de las hojas y corteza de la UG en ratones albinos con endotoxemia inducida por LPS.

MATERIAL Y METODOS

Materiales

Todas las sustancias químicas fueron de grado analítico y compradas a Sigma Chemical Co. El lipopolisacárido fue de *Escherichia coli* Serotipo 0111:B4.

Los ratones albinos con un promedio de peso de 33 g, fueron comprados en el Bioterio del Instituto Nacional de Salud y se acondicionaron en laboratorio de Investigación y Desarrollo "Alicia Darg Barbieri" del Colegio Químico Farmacéutico del Perú durante una semana antes del experimento.

Preparación de los extractos vegetales

La droga (hojas y corteza) fue micropulverizada. Se prepararon los extractos al 0.50% de hojas (UGH) y de corteza (UGC) en caliente, hirviendo las soluciones durante 15 minutos; luego se dejó enfriar y se filtraron.

Método

Previamente se preparó una solución acuosa de LPS y su administración fue por vía intraperitoneal (i.p.) a la dosis de 3 mg/kg peso, en un volumen de 0.25 ml. Simultáneamente se prepararon los extractos y después de 5 horas se administraron i.p. en un volumen de 0.50 ml; al mismo tiempo también otro grupo de ratones recibió la aminoguanidina (AG) i.p. a la dosis de 20 mg/kg, los controles recibieron agua destilada. 3 horas después todos los ratones fueron sacrificados por decapitación y se recogió la sangre para la determinación del NO en tubos heparinizados. El NO fue determinado indirectamente mediante la cuantificación de su metabolito estable nitrito (NO_2^-) (9-12), de acuerdo con la metodología mencionada en (13).

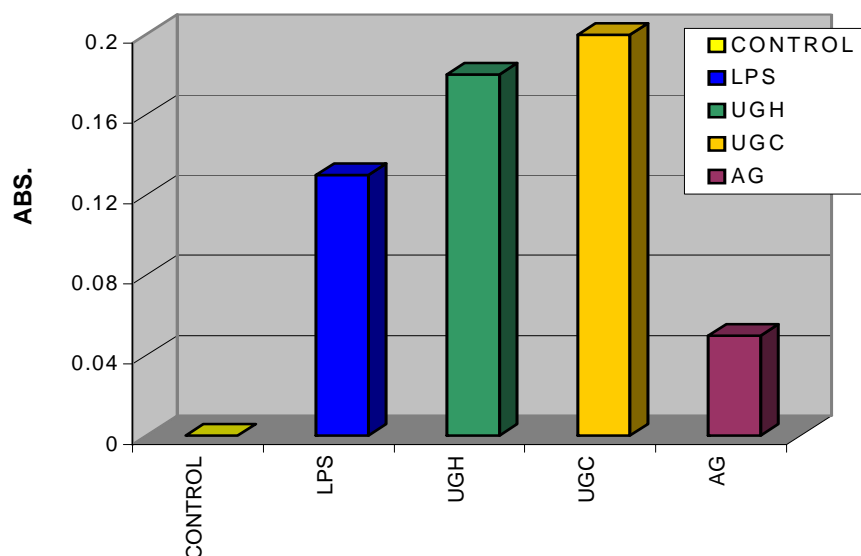
Análisis estadístico

Este experimento fue repetido tres veces y los resultados son expresados como medias \pm S.E.M. Las diferencias estadísticas fueron identificadas utilizando el análisis de varianza (ANOVA), la comparación de las medias se hizo por el método de la diferencia significativa. Una $p < 0.05$ fue considerada significativa.

RESULTADOS Y DISCUSION

A pesar que varios trabajos *in vitro* han demostrado la acción inmunoestimulante de la corteza de UG (1, 5), no hay reportes de estudios *in vivo* que lo relacione con el LPS; así como también, hasta ahora poca atención han merecido las hojas. Los estudios

clínicos realizados en animales y humanos han utilizado solamente a la corteza (6-8). En esta publicación presentamos un primer reporte de la actividad de las hojas y corteza de la UG en ratones con endotoxemia inducida por LPS. En macrófagos y otros leucocitos, las endotoxinas (LPS) y las citoquinas (14) producen la síntesis *de novo* de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) y se genera grandes cantidades de óxido nítrico (NO) como una sustancia citotóxica que ayuda en la destrucción de células tumorales y microorganismos invasores (15).



Nuestros resultados concuerdan con Stuerh y Marletta (16) y otros (14, 15) que indican que el LPS provoca la expresión de la iNOS en macrófagos y otras células de mamíferos (17); el efecto que produce la AG (Fig 1) al disminuir muy significativamente la sobreproducción de NO, confirma la presencia de la iNOS. Por el contrario, tanto el UGH como el UGC sorprendentemente potenciaron en forma significativa la producción de NO en los ratones con LPS. Según Morris y Billiar (18), la expresión de la iNOS es el resultado de una respuesta inflamatoria que puede ser localizada o difusa que resulta de una infección o una lesión. Entonces, donde la respuesta inflamatoria es parte de una respuesta adaptativa (p.e. infección o sepsis), la expresión de la iNOS es beneficiosa; cuando la expresión de la iNOS es parte de una situación no adaptativa (inflamación crónica), puede ser perjudicial. Otros autores (19) también afirman que la expresión de la iNOS en endotoxemia es citoprotectivo, actúa inhibiendo la microtrombosis al prevenir la adhesión plaquetaria y el daño mediado por radicales libres de oxígeno. Como se sabe, el LPS induce daño oxidativo agudo (20).

El hecho de que el efecto del UGH y UGC se presentó cuando previamente se provocó el estrés (oxidativo) por LPS, tiene cierta coincidencia con los resultados que vienen obteniendo Angulo y col en pollos de carne sometidos a estrés medioambiental, en estos animales la UGH, aumenta los niveles de NO. A la luz de los conocimientos actuales, el NO constituye un nuevo sistema antiestrés y actúa como mediador en el proceso de adaptación a una nueva situación que experimentan los organismos (21); nuestros resultados también pueden tener este significado, toda vez que se trata de un método de shock séptico agudo (22). Además, tanto el extracto acuoso de hojas (UGH) como de la corteza (UGC) no modificaron los niveles basales de NO en los ratones que se

usaron como control (normales); lo cual también se observa en pollos de carne cuando son criados en óptimas condiciones. Entonces, existe la posibilidad de que el NO generado por el efecto de la UG sea protectoro!

Tradicionalmente, se viene usando a la corteza de la UG hirviendo 20 g de corteza en un litro de agua, es decir al 2% (23), un vaso de 200ml equivale a 4 g de corteza; entonces, su dosis promedio es de 80 mg/kg. La dosis usada en el ratón ha sido aproximada a ésta; la diferencia es la vía de administración y la especie animal. Tendrá el mismo efecto si la administración fuera oral?, hasta qué tiempo después de la administración del LPS se presentará un efecto significativo?, y cómo éstas variables se correlacionan con el tiempo de sobrevivencia del animal?; son interrogantes que merecen ser resueltas para aproximarnos a una mejor interpretación de estos resultados. Estudios adicionales se requieren para conocer si se obtienen los mismos resultados cuando la administración de los extractos de UG son previos al estrés oxidativo inducido por el LPS.

En este modelo experimental, hemos encontrado que tanto el UTH como el UTC tienen actividad significativa ($p < 0.05$); siendo mayor el efecto del UTC; lo contrario se observó en un modelo de inflamación intestinal crónica, donde las hojas presentaron la mayor actividad y los alcaloides no tuvieron efecto (24). Entonces, tampoco se debe omitir la importancia que tiene aislar los fitoquímicos responsables o la fracción activa, y determinar si existe una correspondencia dependiente de la concentración (dosis-respuesta).

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de las hojas y de la corteza de la *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato) aumenta significativamente la producción de óxido nítrico en ratones albinos con endotoxemia por lipopolisacárido; sin embargo, la corteza presenta la mayor actividad. Quedan pendientes varias interrogantes que merecen ser resueltas para conocer mejor el significado de estos resultados.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Juan de Dios Zúñiga, Gerente General de AGROSELVA, quien nos donó gentilmente las muestras de hojas y corteza de *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato).

BIBLIOGRAFIA

1. Wagner HKM, Kreutzkamp B, Jurcic K (1985). The alkaloids of *Uncaria tomentosa* and their phagocytosis increasing effects. *Planta Medica*, 51: 419-423.
2. Keplinger K, Wagner HKM, Kreutzkamp B (1989) Oxindole alkaloids having properties stimulating the immunologic system- US Patents 4,244,901.
3. Keplinger K, Wagner HKM, Kreutzkamp B (1990) Oxindole alkaloids having properties stimulating the immunologic system- US Patents 4,940,425.
4. Wagner HKM (1995) Inmunostimulants and adaptogens from plants. In: Arnason J, Mata R, Romero J (Eds.), *Phytochemistry of Medicinal Plants: Record of Advanced Phytochemistry*, 29. Plenum, New York, pp. 1-18.
5. Lemaire I, Assinewe V, Cano P, Awang DVC, Arnason JT (1999) Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 109-115.
6. Klymenko M, Bazica M (1998) Informe sobre el resultado del uso del extracto liofilizado de *Uncaria tomentosa*. Centro de investigación en medicina de radiación de la Academia de Ciencias Médicas de Ucrania. Boletín INMETRA. Lima-Perú.
7. Ruiz Urbina (1995) Experiencias en el empleo de *Uncaria tomentosa* o uña de gato en clínica veterinaria (manuscrito).

8. Soto Requena LR (2000) Efecto inmunoestimulante de la Uña de Gato (*Uncaria tomentosa*) en pollos de carne inmunodeprimidos. Proyecto de Tesis de grado de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 16p.
9. Moshage H, Kok B, Huizenga R, Jansen P (1995) Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*, 41: 892-896.
10. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB Jr (1996) Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol*, 268: 142-151.
11. Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1): 62-71.
12. Matas Cascos P, Morales Martín AI, Angulo Herrera P, Silva Do Amaral C, Núñez Bravo MD, Míguez Santillán MP (2001) Determinación de los niveles de nitratos/nitritos en plasma como indicador de la producción de óxido nítrico. *Química Clínica*, 20 (5): 402.
13. Angulo Herrera P, Espinoza Blanco JA, Fernández Anhuamán VE, Díaz Coahila D (2004) Primer reporte sobre niveles elevados de nitritos en plasma de pollos de carne, ¿un hallazgo trascendental?. *MV Rev de Cien Vet*, 20(2): 3-5.
14. Stoclet JC, Fleming I, Gray G, Julou-Schaeffer G, Sneider F, Schott C, Parratt JR (1993) Nitric oxide and endotoxemia. *Circulation* 87, Suppl. V: V77-V80.
15. MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 15: 323.
16. Stuehr DJ, Marletta MA (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 7738-7742.
17. MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 15: 323.
18. Morris SM, Billiar TR (1994) New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*, 266: E829-E839.
19. Kroncke KD, Feshel K, Kolb-Bachofen V (1997) Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection: how, why and where? *Nitric oxide Biol Chem*, 1: 107.
20. Ghezzi P, Saccardo B, Bianchi M (1986) Role of reactive oxygen intermediates in the hepatotoxicity of endotoxin. *Immunopharmacology*, 12: 241-244.
21. Malyshev I, Manukhina EB (1998) Stress, adaptation and nitric oxide (review). *Biochemistry*, 63: 992-1006.
22. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner J-D; Cohen J (1991) Septic shock: pathogenesis. *Lancet*, 338: 732-736.
23. Obregón LE (1995) *Cat's claw, Uncaria genus. Botanical, chemical and pharmacological studies of Uncaria tomentosa (Willd.) D.C. (Rubiaceae) and Uncaria guianensis (Aubl.) Gmel.* Lima, Perú: Instituto de Fitoterapia Americano.
24. Angulo HP, Wilder AR, Míguez SMP, Matas CP (2000) Actividad de las hojas y alcaloides de la uña de gato (*Uncaria tomentosa* Willd. D.C.) en el modelo de la inflamación intestinal crónica de Yamada *et al.* *Revista de la Academia Peruana de Farmacia*, XV: 37-44.