

# ACTIVIDAD DE LAS HOJAS Y ALCALOIDES DE LA UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa* Willd DC) EN EL MODELO DE INFLAMACIÓN INTESTINAL CRÓNICA DE YAMADA ET AL

Angulo Herrera P<sup>1</sup>, Wilder Atao R<sup>2</sup>, Miguez Santillán MP<sup>3</sup>, Matas Cascos P<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Mayor de San Marcos; <sup>2</sup>Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga;

<sup>3</sup>Universidad de Extremadura (España)

## RESUMEN

La *Uncaria tomentosa* Willd. D.C. (Rubiaceae) comúnmente conocida como “uña de gato”, es una liana que crece silvestremente en la Amazonía peruana. La decocción de la corteza es ampliamente usada para el tratamiento de males digestivos y otras inflamaciones. El propósito de esta investigación fue determinar la actividad antiinflamatoria de la corteza, hojas y los alcaloides de las hojas de la *Uncaria tomentosa* usando el modelo de la inflamación intestinal crónica propuesto por Yamada *et al* (1993). Los extractos acuosos fueron administrados p.o. diariamente (dos veces) a la dosis de 40 mg/kg del material seco. Tanto la corteza como las hojas tuvieron efecto protector en las ratas con enteritis inducida por indometacina, normalizando la arquitectura de la mucosa y atenuando la infiltración de granulocitos. Sin embargo, las hojas de *Uncaria tomentosa* fueron las más efectivas y los alcaloides no presentaron actividad en este modelo experimental.

## INTRODUCCION

Aunque la etiología de la inflamación crónica intestinal aún no está definida, muchas investigaciones evidencian que los radicales libres y los oxidantes tienen un rol importante en el daño a nivel celular y tisular (1). Las sustancias que inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno han presentado beneficios experimentales (2) pero su uso terapéutico es limitado por sus reacciones colaterales (3); como alternativa se vienen ensayando a los productos naturales (4). La Amazonía peruana, es poseedora de una rica y variada biodiversidad, con grandes posibilidades de encontrar sustancias naturales con actividad antioxidante y antiinflamatoria (5) como la “uña de gato” (*Uncaria tomentosa* Willd. D.C.), la decocción de su corteza es muy utilizada en males digestivos y otras inflamaciones (6). Keplinger *et al* han publicado una amplia revisión acerca del uso etnomedicinal y los nuevos resultados botánicos, farmacológicos y toxicológicos de la corteza de *Uncaria tomentosa* (7).

Recientemente, Sandoval-Chacón *et al* han demostrado que la corteza de *U. tomentosa* degrada directamente al oxidante peroxinitrito y previene la activación del factor transcripcional NF-κB, inhibiendo la expresión de genes asociados con la inflamación (8) como el TNFα (9). Estos investigadores han propuesto la primera evidencia mecanística de la acción antiinflamatoria de la corteza de uña de gato.

Sin embargo, este estudio no se ha extendido a la hoja. Por este motivo nos propusimos evaluar *in vivo* el efecto de las hojas y alcaloides de la *Uncaria tomentosa* en el modelo de la inflamación intestinal crónica propuesto por Yamada *et al* (10) y comparar su actividad con la corteza.

## SUMMARY

*Uncaria tomentosa* Willd., D.C. (Rubiaceae) commonly known as cat's claw or “uña de gato”, is a woody liana that grows wild in the Peruvian Amazonian. Decoctions of the root bark are widely used for the treatment of digestive complaints and other inflammatory disorders. The purpose of this research was to determine the anti-inflammatory activity of cat's claw bark, leaves and alkaloids from leaves using a model of chronic intestinal inflammation proposed by Yamada *et al* (1993). Aqueous extracts were given orally at daily (twice) doses 40 mg/kg of dried material. Both bark and leaves had protective effect on rats indomethacin-induced enteritis, normalizing mucosal architecture and attenuating granulocyte infiltration. However, leaves of *Uncaria tomentosa* were the most effective and the alkaloids from leaves were not activity in this experimental model.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Reactivos*

Todas las sustancias químicas fueron de grado analítico y obtenidas de Sigma Chemical Co.

### *Material vegetal y extracción acuosa*

El material vegetal fue recolectado en San Francisco (Ayacucho-Perú) e identificado por el Dr. Juan de Dios Zúñiga como *Uncaria tomentosa* Willd. D.C. (11). Los extractos se prepararon hirviendo en agua destilada la corteza (UtC) o las hojas (UtH) pulverizadas (1 g/100 ml) durante 30 minutos y se dejó enfriar a la temperatura ambiente durante toda la noche. El extracto fue decantado y centrifugado a 3,500 rpm durante 20 minutos. Estas soluciones se mantuvieron en refrigeración y fueron usadas durante todo el experimento.

### *Extracción de los alcaloides*

Se procedió de acuerdo con Stuppner *et al* (12). Brevemente: 100 ml del extracto UtH fue acidificado y extraído con acetato de etilo (3 x 40 ml), luego alcalinizado con amoníaco y extraído nuevamente con acetato de etilo (4 x 40 ml). El extracto fue evaporado y disuelto en 100 ml de agua destilada ligeramente ácida.

### *Control del peso*

Diariamente se registró el peso de todos los animales, antes de las 9 am.

### *Inflamación intestinal crónica inducida por indometacina.*

Se utiliza la rata como modelo animal (13). Dosis subletales de indometacina producen inflamación crónica en el yeyuno medio que persiste durante varias semanas (14) y se caracteriza por ulceraciones lineales, engrosamiento y dilatación del intestino delgado, adhesiones, obstrucción parcial, inflamación granulomatosa transmural aguda y crónica, absceso a las criptas y fibrosis. Para evaluar la actividad antiinflamatoria de *U. tomentosa* en el modelo de Yamada *et al* (10), se utilizaron 60 ratas Wistar machos de aproximadamente 250 g a las que se les acondicionó en el laboratorio y se les suministró alimento y agua *ad libitum* los 5 días antes del experimento. La inflamación intestinal crónica fue inducida mediante dos inyecciones s.c. (7.5 mg/kg) de indometacina, administradas diariamente a las 9 a.m., en un intervalo de 24 horas. Los extractos de UtC y UtH fueron administrados oralmente mediante sonda orogástrica, 9 a.m. y 3 p.m.) a la dosis de 40 mg/kg. Los animales fueron divididos en 6 grupos: (A) grupo control (vehículo, NaHCO<sub>3</sub> 5%), (B) inyectado s.c. con indometacina, (C) inyectado con indometacina y suplementado con UtC, (D) inyectado con indometacina y suplementado con UtH, (E) inyectado s.c. dos veces con el vehículo y suplementado con UtC, y (F) inyectado s.c. dos veces con el vehículo y suplementado con UtH. Todos los animales tuvieron agua y alimento *ad libitum*. Las ratas del grupo A y B recibieron agua destilada por vía oral (4 ml/kg).

### *Determinación del daño intestinal*

Después de siete días de la primera administración con indometacina, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y se procedió a la necropsia. Se extrae el yeyuno medio y se abre por lado apuesto al mesenterio, se lava con suero fisiológico y se fija en formol 10% para su estudio histopatológico.

### *Análisis estadístico*

Los resultados de la disminución del porcentaje del peso corporal son expresados como la medias  $\pm$  S.E.M. Las diferencias estadísticas fueron identificadas utilizando el análisis de la varianza (ANOVA). Una probabilidad de  $p < 0.05$  fue considerada significativa.

## RESULTADOS

Los lotes tratados con UtC y UtH presentaron significativamente menor porcentaje de disminución del peso corporal en comparación con las ratas que sólo recibieron Indometacina. El UtH es más activo, los animales alcanzaron la recuperación del peso inicial al quinto día de la primera administración de Indometacina, mientras que el UtC no lo hizo mientras duró el experimento (Fig. 1). Por el contrario, los animales que fueron tratados con los alcaloides de la hoja presentaron disminución similar al lote de indometacina.

Todos los animales tratados con la corteza y los alcaloides de la uña de gato tuvieron diarrea el primer día del experimento; el 80% del lote con Indometacina y solamente el 20% de animales en el lote tratado con

UtH, en este último no se observó diarrea en el segundo día, pero persistió en un 40% en el lote UtC. La diarrea se prolongó en los lotes tratados con los alcaloides de la *U. tomentosa* y con Indometacina (Tabla 1).

Macroscópicamente, las ratas tratadas con los alcaloides de las hojas de uña de gato presentaron el mesenterio hemorrágico, nódulos y ganglio linfático inflamado, engrosamiento y dilatación del intestino delgado mayormente en la porción media (yeyuno), también son frecuentes las adhesiones. En la parte interna del yeyuno medio se aprecian zonas hiperémicas, ulceración lineal con áreas necróticas; hay pérdida parcial de la mucosa (Fig. 3). Microscópicamente, se observa que la ulceración y la necrosis se prolonga hasta la capa muscular; hay abundante presencia de células inflamatorias (neutrófilos) (Fig. 4). Todas estas características son compatibles con los animales que sólo recibieron Indometacina. Histológicamente las ratas que recibieron el UtH presentaron las mejores condiciones, con características similares a las normales, además se observa hiperplasia en las células de Lieberkum (regeneración) (Fig. 5). Los lotes E y F, no presentaron alteraciones morfológicas (Fig. 2.).

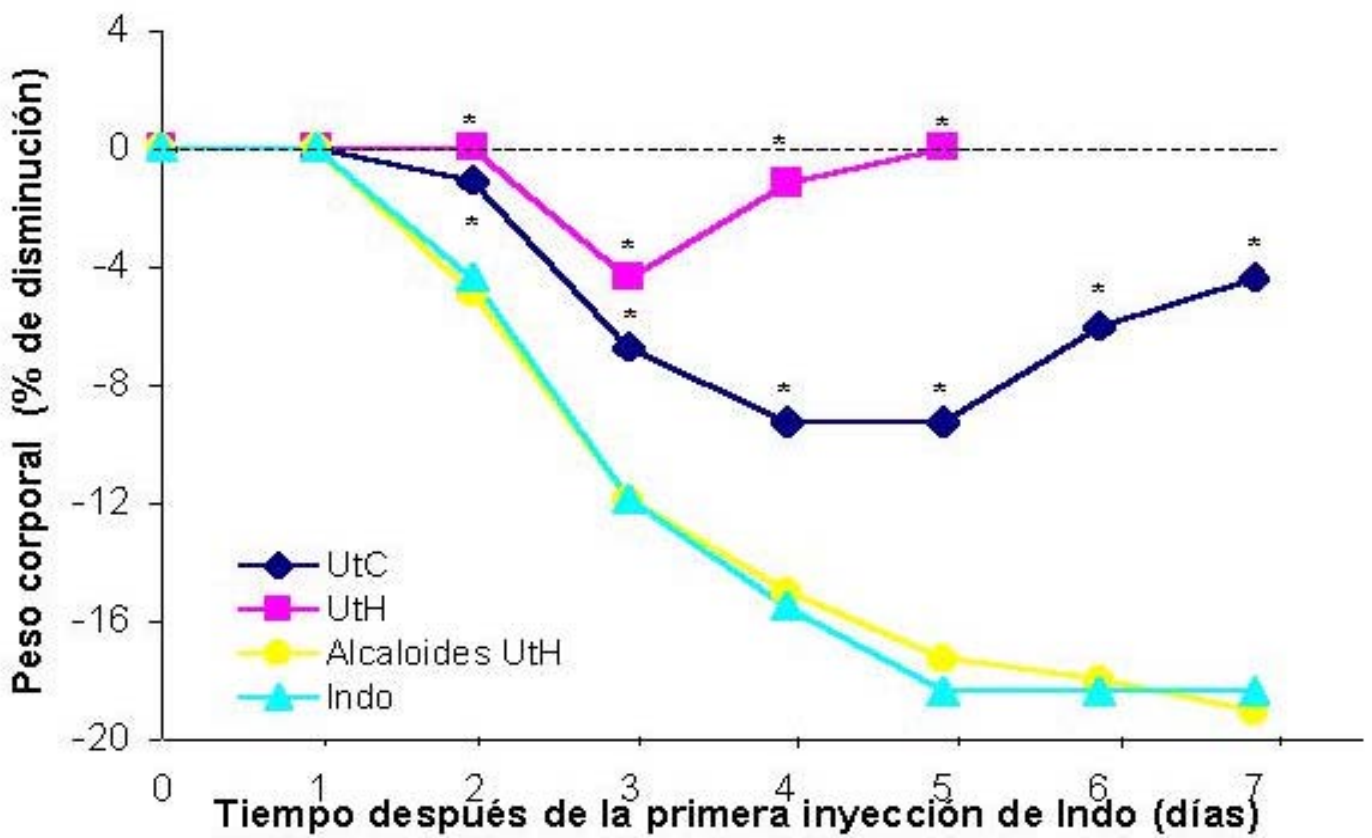


Fig. 1. Efecto del extracto 1% de hojas (UtH) y corteza (UtC) de la *Uncaria tomentosa* en la disminución del peso corporal de ratas administradas con dos inyecciones subcutáneas de indometacina (7.5 mg/kg). \*representa  $P < 0.005$  comparado con el lote de indometacina.

Tabla 1. Porcentaje de animales que presentaron diarrea durante el experimento

LOTES	1er	2do	3er	4to	5to	6to	7mo
Indo	80	60	60	40	40	40	40
Alcaloides	100	80	60	40	40	20	20
UtC	100	40	0	0	0	0	0
UtH	20	0	0	0	0	0	0

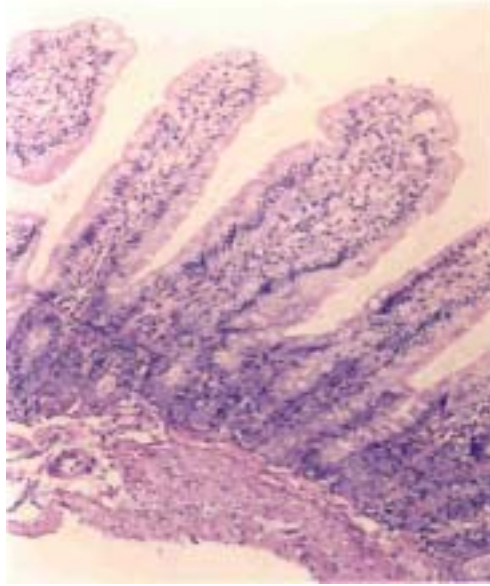


Fig. 2. Corte histológico del epitelio intestinal normal



Fig. 3. De arriba hacia abajo, intestino delgado tratado con indometacina después de 8 días; intestino normal, tratado con UtH y con Utc. Estas dos últimas aún presentan la dilatación intestinal.

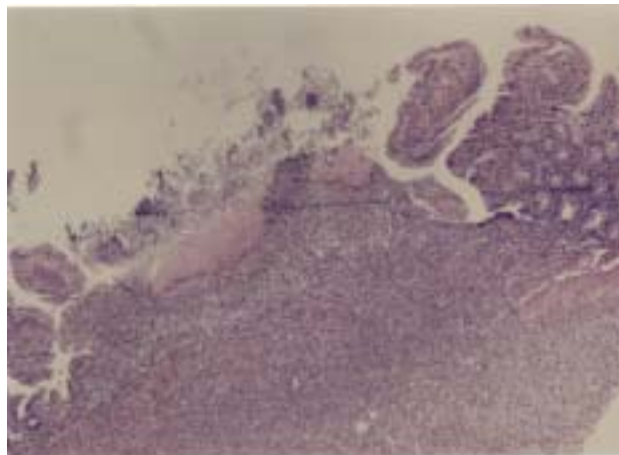


Fig. 4. Corte histológico del epitelio intestinal destruido, la ulceración alcanza la capa muscular

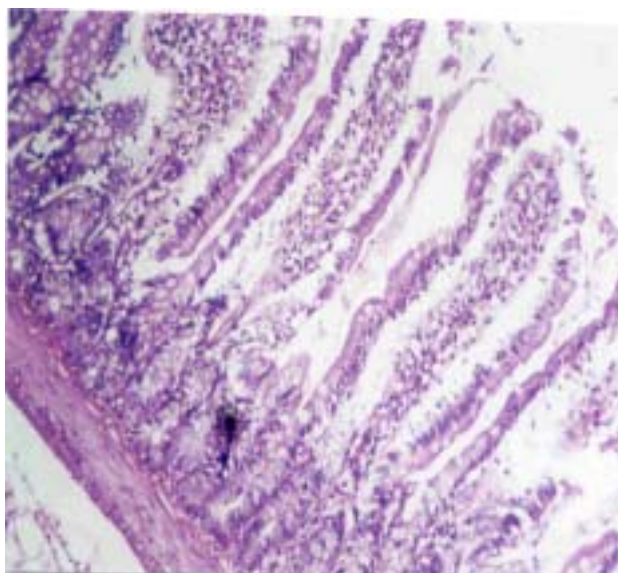


Fig. 5. Corte histológico del epitelio intestinal tratado con UtH

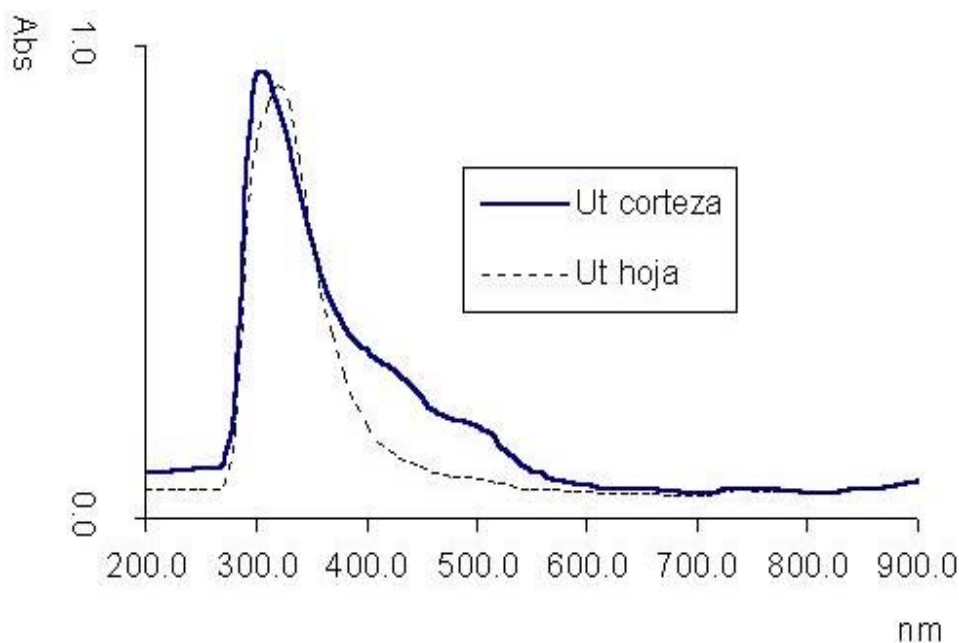


Fig. 6. Espectro del extracto acuoso de la corteza ( $\lambda_{max}$  310 nm) y de hojas de *Uncaria tomentosa* ( $\lambda_{max}$  320 nm)

## DISCUSION

Todo proceso inflamatorio se inicia por la presencia de algún agente que pone en marcha una serie de sustancias que pueden atraer a los leucocitos (polimorfo nucleares neutrófilos) y luego se produce la infiltración de estas células inmunocompetentes en el tejido afectado. Esta activación estimula la producción de radicales libres y oxidantes derivados del oxígeno y del nitrógeno que debido a su inespecificidad también afectan a las células dando lugar a lesiones tisulares (15, 1, 16, 17, 18), como las úlceras. Este proceso oxidativo puede agravarse, y de hecho así sucede, por la disminución de los antioxidantes fisiológicos en la inflamación, circunstancia que ha sido demostrada en procesos inflamatorios intestinales como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa (19). Una estrategia terapéutica para reducir la intensidad del daño tisular consiste en modificar la acción de estas especies reactivas, como sucede con el 5-ASA (mesalamina) (20) o, por la inhibición de su síntesis, que sería el caso de la sulfasalacina y olsalacina (21). Estos tratamientos son costosos y fuera del alcance de la población; sin embargo, en nuestro país existe una rica tradición en el uso de plantas medicinales con actividad antiinflamatoria (22) que pueden ser fuente para la búsqueda de nuevos antioxidantes naturales con efectos terapéuticos mayores que los conocidos o que operen con mecanismos novedosos, se requiere de modelos experimentales para evaluar científicamente estos recursos terapéuticos.

Una de estas especies promisorias es la uña de gato (*Uncaria tomentosa* Willd. D.C.); aunque las investigaciones realizadas en esta especie se han focalizado principalmente en la corteza y particularmente en los alcaloides (7). Hasta ahora no se había experimentado esta actividad en las hojas.

Yamada *et al* (10) proponen que la enteritis inducida por dos inyecciones de indometacina representa un modelo conveniente y reproducible de la inflamación intestinal crónica, con características fisiológicas e histológicas similares a la enteritis de Crohn, habiendo investigado el efecto de algunas (de) drogas usadas en el tratamiento de la inflamación intestinal. La sulfasalazina y el metronidazol redujeron significativamente el aumento de la permeabilidad intestinal y la pérdida de peso inducida por indometacina, siendo el metronidazol más efectivo que la sulfasalazina (10). Sandoval *et al* utilizaron este modelo para evaluar la acción antiinflamatoria de la corteza de uña de gato y encontraron que la solución al 0.5% administrada en el agua de bebida etenuó marcadamente la enteritis inducida por indometacina, lo que se evidenció en la reducción del daño morfométrico, de la actividad mieloperoxidasa y la expresión de metalotioneina hepática (8). Previamente estos investigadores demostraron *in vitro* que el extracto acuoso de la corteza de UtC disminuye la toxicidad celular producida por el peroxinitrito, un poderoso oxidante que se forma de la reacción entre el óxido nítrico y el superóxido, lo cual es consistente con otros estudios (23).

Nuestros resultados demuestran por primera vez que, las hojas de la *Uncaria tomentosa* tienen actividad antiinflamatoria y es mayor que la corteza, de acuerdo a los resultados histopatológicos. Se observa mayor integridad de la mucosa intestinal y menor infiltración de granulocitos. Esto podría ser por la diferente composición química o por la concentración de las sustancias activas. Los animales de los lotes E y F no presentaron alteraciones morfológicas a la dosis utilizada de los extractos, lo cual es compatible con el uso tradicional de esta especie. Además, los animales tratados con UtH presentan el menor porcentaje de pérdida de peso y la recuperación fue más rápida que en el lote tratado con UtC (Fig. 1). Estos datos muestran una asociación positiva con el daño intestinal inducido por la Indometacina, algo similar ocurre entre la frecuencia y duración de la diarrea con el porcentaje de pérdida de peso; consistente con estos resultados, las ratas tratadas con las hojas de Ut consumieron significativamente más alimento durante todo el experimento (dato no mostrado). Esto es interesante y se requiere de más experimentos para determinar el grado de correlación entre estos parámetros y su posible utilidad como método no invasivo en la evaluación antiinflamatoria de productos naturales.

Se ha propuesto que la actividad antiinflamatoria de la corteza de *Uncaria tomentosa* en el edema plantar de la rata es debido a principios activos diferentes. Senatore *et al* le atribuyen a la presencia de  $\beta$ -sitosterol (24), Aquino *et al* a los glicósidos del ácido quinóico (25), mientras que Rojas *et al* la atribuyen a la presencia mayoritaria de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (26). Nosotros hemos encontrado que las ratas tratadas con los alcaloides extraídos de las hojas no protegieron y presentaron un cuadro ulcerativo similar al producido por la indometacina, esto no excluye una posible actividad a dosis diferentes a la que hemos ensayado o que la diferencia sea por el modelo experimental utilizado.

Aunque no está en nuestros objetivos la aproximación fitoquímica a los principios activos responsables de esta actividad, es importante destacar que las sustancias mayoritarias en el UtC y UtH, absorben a 310 nm y 320 nm respectivamente (Fig. 6), siendo la menor concentración en la corteza. Estos compuestos podrían estar relacionados con la actividad antiinflamatoria intestinal, ya que los alcaloides absorben a 245 nm (12). Entonces, existe la posibilidad de encontrar nuevas sustancias bioactivas en las hojas de *Uncaria tomentosa*, su confirmación incrementaría su valor económico y, de hecho, convierte a la hoja en una alternativa más viable para obtener estos compuestos. Por tanto, se requiere de trabajos adicionales para evaluar en este modelo experimental la participación de los alcaloides y de otros nuevos compuestos de la hoja de uña de gato.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gross V, Arndt H, Andus T, Palitzsch KD, and Scholmerich J (1994) Free radicals in inflammatory bowel diseases pathophysiology and therapeutic implications. *Hepatology*, 41: 320-7.

2. Allgayer H, Hofer P, Schmidt M, Bohne P, Kruis W, and Gugler R (1992) Superoxide, hydroxyl and fatty acid radical scavenging by aminosalicylates. Direct evaluation with electron spin spectroscopy. *Biochemical Pharmacology*, 43: 259-62.
3. Davies NM, and Jamali F (1997) Pharmacological protection of NSAID-induced intestinal permeability in the rat: effect of tempo and metronidazole as potential free radical scavengers. *Human & Experimental Toxicology*, 16: 345-349.
4. Sastre J, Millán A, de García la Asunción J *et al* (1998) A ginkgo biloba extract (Egb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 24: 298-304.
5. Angulo Herrera P (1997) *La Medicina Tradicional en el Desarrollo de Fitomedicamentos, el Enfoque Etnofarmacológico*. Lima, Perú: De Mar.
6. 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.
7. Keplinger K, Laus G, Wurn M, Dierich MP, and Teppner H (1999) *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. – ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 23-34.
8. Sandoval-Chacón M, Thompson JH, Zhang X-J, Liu X, Mannick EE, Sadowska-Krowiscka H, Charbonnet RM, Clark DA, and Miller MJS (1998) Anti-inflammatory actions of cat's claw: the role of NF- $\kappa$ B. *Aliment Pharmacol Ther*, 12: 1279-1289.
9. Sandoval-Chacón M, Charbonnet RM, Okuhama NN, Roberts J, Krenova Z, Trentacosti AM, and Miller MJS (2000) Cat's claw inhibits TNF $\alpha$  production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(1): 71-78.
10. Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, and Grisham MB (1993) Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation*, 17: 641-62.
11. Zúñiga Quiroz JD (1999) *Nuevos Aspectos en el Estudio Agronómico y Fitoquímico de las dos Especies Peruanas del Género Uncaria*. Lima, Perú: Instituto Nacional de Medicina Tradicional.
12. Stuppner H, Sturm S, and Konwalinka G (1992) HPLC analysis of the main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *Chromatographia*, 34: 597-600.
13. Davies NM, Wright MR, and Jamali F (1994) Antiinflammatory drug-induced small intestinal permeability. The rat is a suitable model. *Pharmaceutical Research*, 11: 1652-1656.
14. Sartor RB, Bender DE, and Holt L (1992) Susceptible of inbred rat strains to intestinal inflammation induced by indomethacin. *Gastroenterology*, 102: A690.
15. Cuvelier C, Mielants H, De VM, Quatacker J and Veys E (1994) Idiopathic inflammatory bowel diseases: immunological hypothesis. *Acta Gastroenterol Belg*, 57: 292-9.
16. Harris ML, Schiller HJ, Reilly PM, Donowitz M, Grisham MB, and Bulkley GB (1992) Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: cause, consequence or epiphenomenon?. *Pharmacology & Therapeutic*, 53: 375-408.
17. Rachmilewitz D, Stampler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z and Podolsky DK (1995) Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 36: 718-23.
18. Oudkerk PM, Bouma G, Visser JJ, Kolkman JJ, Tran DD, Meuwissen SG, and Pena AS (1995) Serum nitrate levels in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 30: 784-8.
19. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, and Doe WF (1996) Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation*, 98: 136-141.
20. Pearson DC, Jourdeuil D, Meddings JB (1996) The antioxidant properties of 5-aminosalicylic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, 21: 367-73.
21. Nielsen OH, Bouchelouche PN, Berild D, and Ahnfelt RI (1993) Effect of 5-aminosalicylic acid and analogous substances on superoxide generation and intracellular free calcium in human neutrophilic granulocytes. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 28: 527-32.
22. De Feo (1991) Uso di piante ad azioni antiinfiammatoria nell'Alto Ucayali, Perú orientale. *Fitoterapia*, LXII (6): 481-494.
23. Desmarchelier C, Mongelli E, Coussio J, and Ciccia G (1997) Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Phytotherapy Research*, 11: 254-6.
24. Senatore A, Cataldo A, Iacarino FP, and Elberti MG (1989) Phytochemical and biological study of *Uncaria tomentosa*. *Bulletin de la Société Italie Speriment*, 65: 517-520.
25. Aquino R, De Feo V, De Simone F, Pizza C, and Cirino G (1991) Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *Journal of Natural Product*, 54: 453-59.
26. Rojas PA, Capcha RC, De la Cruz W, and Aguilar JL (2000). En *Resúmenes del I Congreso Nacional e Internacional FITO 2000*, 26-30 oct, pag 160. Lima, Perú: Instituto de Fitoterapia Americano.