

## Efecto Inmunoestimulante De La *Uncaria Tomentosa* En Ratas Inmunodeprimidas Con El Uso De Ciclofosfamida

Núñez-Reyna, Diana Paola<sup>1</sup>; Huamán-Dávila, Angélica María<sup>1</sup>; Llaque-Chávarri, Fabiana<sup>2\*</sup>; Huamán-Saavedra, Juan Jorge<sup>3</sup>; Castillo-Soto, Wilson Lino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Perú.

<sup>2</sup>Semillero en Investigación en Sanidad de Animales de Compañía de la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Perú.

<sup>3</sup>Escuela de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Perú.

\*fllaquec1@upao.edu.pe

### Resumen

*Uncaria tomentosa* (UT), comúnmente conocida como “uña de gato”, es una planta medicinal que contiene propiedades inmunoestimulantes debido a sus componentes alcaloides, además representa una alternativa de tratamiento de bajo costo. Por ello, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto inmunoestimulante de esta planta en 29 ratas de laboratorio, las cuales fueron divididas en 4 tratamientos. El T1 fue el grupo control que únicamente recibió solución salina (SS); el T2 fue administrado ciclofosfamida (CFF) a dos dosis de 50mg/kg para inmunosuprimir a las ratas; mientras que, el T3 y T4 recibieron la tintura de uña de gato a una dosis de 100mg/kg y 200mg/kg, respectivamente. Con respecto a la serie roja, no se evidenciaron cambios significativos entre los tratamientos. Por otro lado, en la serie blanca, se pudo observar que los ejemplares de los grupos T3 y T4 presentaron un aumento en los valores de linfocitos y neutrófilos. Además, en la celularidad de las muestras obtenidas de bazo, médula ósea y timo, se pudo observar que el tratamiento T4 fue el más eficaz en cuanto al bazo y médula ósea. Sin embargo, la dosis de 100mg/kg (T3) obtuvo mejores resultados con respecto al timo. Se concluye que la *Uncaria tomentosa* no tiene efecto sobre la serie roja, pero sí es capaz de elevar los valores leucocitarios, tales como los neutrófilos y linfocitos.

**Palabras Claves:** *Uncaria tomentosa*, uña de gato, inmunoestimulante, ciclofosfamida, glóbulos blancos, leucocitos.

### Abstract

*Uncaria tomentosa* (UT), more commonly known as cat's claw, is a medicinal plant that contains immunostimulating properties due to its alkaloid components, it also represents a low-cost treatment alternative. The present investigation's objective was to evaluate the immunostimulating effect of this plant in 29 laboratory rats, which were divided into 4 different treatments. T1 was the control group that only received saline solution; T2 was administered cyclophosphamide at two doses of 50mg/kg to immunosuppress the rats; meanwhile, T3 and T4 received cat's claw tincture at a dose of 100mg/kg and 200mg/kg, respectively. The red blood cell values showed no significant changes between the treatments applied. However, with the white blood cells values, it was observed that the specimens of groups T3 and T4 presented an elevation in the parameters of lymphocytes and neutrophils. In addition, the cellularity was visualized from samples from the spleen, bone marrow and thymus; it was observed that the T4 treatment was the most effective for the spleen and bone marrow. However, the 100mg / kg dose (T3) had better result with respect to the thymus. It is concluded that *Uncaria tomentosa* has no effect on the erythrocytes, but it is capable of raising leukocyte values, such as neutrophils and lymphocytes.

**Keywords:** *Uncaria tomentosa*, cat's claw, immunostimulant, cyclophosphamide, white blood cells, leukocytes.

## Introducción

Actualmente, el interés por poseer animales de compañía ha ido incrementando; es por esto que, la labor de los médicos veterinarios se ha vuelto más indispensable en diversos aspectos, tales como la prevención de patologías y también los tratamientos brindados, de esta manera los pacientes gozarán de una mejor calidad de vida.

En Trujillo, la prevalencia de enfermedades virales en los animales de compañía está incrementando, debido al descuido de las mascotas por sus dueños o por la desinformación acerca de las vacunas y el calendario de vacunación. Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de animales callejeros, los cuales muchas veces son portadores de diversas enfermedades, transmitiéndolas al momento de tener contacto con las mascotas, por lo cual será difícil controlar el contagio y diseminación de estos virus.

Por otro lado, la presencia de cuadros de inmunosupresión puede ser causada por diversos factores, como las enfermedades por virus, bacterias, o parásitos; asimismo, el inadecuado uso de medicamentos, estrés, toxinas o desnutrición también pueden afectar al sistema inmune del animal. Debido a esto, el paciente se encontrará más propenso a las enfermedades secundarias, en especial a los patógenos oportunistas, y será incapaz de producir una respuesta de defensa ante ellos (Fishman, 2013).

En aquellas enfermedades que no tienen una cura o tratamiento específico, como el caso de las enfermedades víricas, se suele aplicar un tratamiento de sostén en base a los signos clínicos o complicaciones secundarias. Asimismo, se debe brindar una alimentación adecuada al paciente, para evitar alteraciones en el sistema inmunológico. No obstante, existen casos en los cuales los pacientes no podrán recibir la atención médica necesaria por distintos motivos, tales como el costo elevado de los tratamientos, lo cual muchas veces será un impedimento (Chiu et al., 2021); por otro lado, la presencia de efectos adversos de ciertos medicamentos también puede ser un obstáculo (Belshaw y Yeates, 2018). Por esto, será necesario buscar alternativas eficaces y económicas.

El uso de plantas medicinales es útil para estos problemas, existe una diversa variedad y según la especie de la planta, cumplirá ciertas funciones. En el caso de *Uncaria tomentosa*, también denominada “uña de gato”, presenta propiedades inmunoestimulantes debido a su contenido de componentes alcaloides (Calvo et al., 2017). Por otro lado, también se ha demostrado que sirve como antiinflamatorio, antioxidante y antitumoral (Gregory et al., 2021; Zhu et al., 2021). Gracias a las propiedades de la uña de gato, se puede implementar un tratamiento novedoso, además presenta el beneficio de tener una producción económica y con precios accesibles; es por esto que, esta investigación plantea como objetivo evaluar el efecto inmunoestimulante de *Uncaria tomentosa* en ratas inmunosuprimidas, con el fin de que pueda emplearse en pacientes enfermos para reforzar la respuesta inmune, o en pacientes sanos para la prevención (Batiha et al., 2020; Francisco et al., 2012).

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Todos los animales utilizados en esta investigación fueron manejados siguiendo el manual de procedimientos para el uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud del Perú (2012), teniendo en cuenta los principios éticos requeridos para la realización de investigaciones con animales vivos.

Se obtuvo un total de 29 ratas machos de edad adulta. Estos ejemplares eran crías de ratas obtenidas del bioterio de la Universidad Nacional de Trujillo; asimismo, todos presentaban un peso aproximado de 200 a 440 gramos, y una edad de 20 a 25 semanas. Por otro lado, 5 de los animales fueron eutanasiados al principio de la investigación, y los restantes recibieron los distintos tratamientos.

Las ratas fueron obtenidas al cruzar 3 machos y 6 hembras, siendo destetados a los 30 días; para luego ser divididos en grupos, los cuales fueron formados por 2 ratas.

### **Instalaciones y alimentación**

Para evitar posibles alteraciones de los resultados por variables externas, se optó por utilizar instalaciones diseñadas para ratas de laboratorio, según la “Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio” elaborada por la Academia Nacional de Medicina (1999).

Asimismo, se evitó la presencia de factores de estrés, ya que el estrés puede causar alteraciones en la prueba, generando resultados falsos. Para ello, se acondicionó un ambiente en el cual no existió contacto con factores externos; de igual manera, para evitar la presencia de gases, se mantuvo una ventilación constante.

Con respecto a la alimentación, los ratones recibieron piensos de BIOVITA, el cual fue repartido entre ambas jaulas de forma equitativa, y agua de manera ad libitum, teniendo acceso las 24 horas.

### **Tratamientos**

Para la experimentación se separaron un total de 4 grupos distintos, a los cuales se les aplicó los tratamientos. El primer grupo (grupo control) recibió solución fisiológica por vía oral e intraperitoneal. El segundo grupo recibió ciclofosfamida por vía intraperitoneal a una dosis de 50mg/kg (en dos dosis) y solución fisiológica por vía oral, constituyendo así, el control positivo. Por último, el grupo tres y grupo cuarto recibieron UT vía oral, a una dosis de 100mg/kg y 200mg/kg, respectivamente, y también ciclofosfamida.

### **Administración la tintura de uña de gato**

El extracto de uña de gato fue proveniente de la ciudad de Tarapoto, producida por Laboratorios Takiwasi; su presentación es del 20%, conteniendo 200mg de corteza de uña de gato diluida en 1mL de alcohol etílico al 80%. Las dosis utilizadas fueron de 100mg/kg y 200mg/kg. Fue administrado de manera diaria, en el mismo horario, desde el tercer día del experimento hasta el día 18, día en el que se suspendió los tratamientos para tomar las muestras correspondientes.

La administración de dicho extracto y la solución fisiológica, se realizó mediante una sonda de poliuretano tamaño 16ga , para verificar que el total de la dilución sea ingerida por el animal.

### **Inmunosupresión**

La inmunosupresión fue inducida en los animales mediante el uso de ciclofosfamida. Los grupos recibieron este medicamento en dos dosis de 50mg/kg, a excepción del grupo control. Fue administrado mediante vía intraperitoneal en el día 2 y día 10.

### **Muestras**

El primer día se eutanasió a 5 ratas para la obtención de datos como base para el conteo celular de los órganos linfoides. Este procedimiento se realizó utilizando Halatal por vía intramuscular, y luego se inyectó T-61 vía intravenosa, para así evitar dolor o incomodidad en el animal.

El tercer día se procedió a obtener las primeras muestras de sangre para realizar los hemogramas. Se utilizó anestesia inhalatoria, aplicando isoflurano mediante un equipo, para así retirar la muestra con mayor facilidad, evitando estrés en el animal; asimismo, también se logra un tiempo de recuperación de la anestesia de forma inmediata. Se extrajo 0.5mL de muestra por cada ejemplar, mediante punción intracardiaca, realizando la recolección en microtubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se transportó dichas muestras al laboratorio en un cooler, en un tiempo menor a 4 horas desde la toma de muestra.

En el día 18, se obtuvo las muestras, utilizando el mismo método para anestésiar y extraer la sangre de los ejemplares. Asimismo, se aplicó el mismo protocolo de eutanasia realizada el primer día, para realizar visualizar la celularidad del bazo, médula ósea y timo.

Con respecto a los hemogramas realizados, las muestras sanguíneas para este análisis fueron procesados en el laboratorio Vet Center. Por otro lado, en cuanto a los órganos linfoides, se realizó el conteo de la celularidad; para ello se utilizó el protocolo de disección del Manual de Inmunología de la Universidad de Granda, para extraer el bazo, timo y médula ósea del fémur. Dichos órganos fueron colocados en una placa Petri para ser disgregados con 8mL de solución Turk; posteriormente se tomó una muestra de 10µl, la cual fue colocada en una cámara de Neubauer, para ser observada microscópicamente. Se aplicó la siguiente fórmula para realizar el conteo:

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

Donde:

Espesor = 0.1mm

### **Análisis estadístico**

Los sujetos fueron distribuidos al azar, con un total de 4 tratamiento y 3 repeticiones, y cada unidad experimental fue constituida por dos ratas. Se utilizó el análisis de varianza y prueba de Tukey para los resultados obtenidos.

## Resultados

### Serie roja

La Tabla 1 muestra los promedios iniciales de los parámetros analizados dentro de la serie roja; también se muestran los valores hematológicos de referencia para las ratas (León et al., 2011). Se puede observar que casi la totalidad parámetros se situaban dentro de los valores referenciales, de igual manera, no hubo diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 1. Valores obtenidos inicialmente en la serie roja antes de aplicar los tratamientos.

Tratamientos	Parámetros			
	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	Eritrocitos (ul)	VCM (fl)
T1	43.93±3.34a	14.33±1.20a	7.35±0.63a	60.2±1.04a
T2	44.28±3.66a	14.28±1.19a	7.30±0.49a	60.7±3.26a
T3	44.52±2.75a	14.73±0.78a	7.67±0.53a	62.47±3.26a
T4	45.87±1.79a	14.80±0.59a	7.60±0.30a	60.47±1.62a
Valores Referenciales	31.40 – 45.0	11.49 – 15.52	5.81 – 8.10	48.60 – 56.20

\*Medias con una letra en común en cada columna no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ) para la prueba de Tukey. T1 = SS (grupo control), T2 = CFF + SS, T3 = CFF + UT (100mg/kg), T4 = CFF + UT (200mg/kg).

En la Tabla 2 se observan los promedios respecto los parámetros de la serie roja al final del experimento, 15 días después de la primera aplicación de *Uncaria tomentosa* a los ejemplares. De igual manera, no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 2. Valores obtenidos en la serie roja después de la aplicación de los tratamientos.

Tratamientos	Parámetros			
	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	Eritrocitos (ul)	VCM (fl)
T1	44.02±3.34a	14.13±1.56a	7.09±0.84a	61.77±2.96a
T2	41.70±0.87	13.47±0.28a	6.87±0.30a	60.87±0.30a
T3	42.22±4.50a	13.65±1.47a	6.91±0.68a	61.17±1.47a
T4	40.60±1.98a	13.10±0.64a	7.67±0.34a	60.52±1.65a
Valores Referenciales	31.40 – 45.0	11.49 – 15.52	5.81 – 8.10	48.60 – 56.20

\*Medias con una letra en común en cada columna no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ) para la prueba de Tukey. T1 = SS (grupo control), T2 = CFF + SS, T3 = CFF + UT (100mg/kg), T4 = CFF + UT (200mg/kg).

### Serie blanca

En la Tabla 3 se observan los promedios iniciales de la serie blanca; asimismo se muestran los valores hematológicos de referencia para las ratas (León et al., 2011). Se encontró una ligera monocitosis, eosinofilia y neutrofilia; por otro lado, no se reportaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 3. Valores obtenidos inicialmente en la serie blanca y plaquetaria antes de aplicar los tratamientos.

Tratamientos	Parámetros							
	Leucocitos (k/ul)	N. segmentados (k/ul)	N. abastionados (k/ul)	Linfocitos (k/ul)	Monocitos (k/ul)	Eosinófilos (k/ul)	Basófilos (k/ul)	Plaquetas (u/l)
T1	12.03±10.52 <sub>a</sub>	3.73±3.26a	0.24±0.21a	7.22±6.31a	0.60±0.53a	0.24±0.21a	0±0a	653.33±104.89a
T2	9.70±3.87a	3.01±1.20a	0.19±0.08a	5.82±2.32a	0.49±0.19a	0.19±0.08a	0±0a	808.00±248.01a
T3	7.03±1.27a	2.18±0.39a	0.14±0.03a	4.22±0.76a	0.35±0.06a	0.14±0.03a	0±0a	732.00±166.67a
T4	7.89±2.02a	2.45±0.62a	0.16±0.04a	4.79±1.21a	0.40±0.10a	0.16±0.04a	0±0a	725.33±308.80a
Valores Referenciales	2.88 – 10.74	5 – 20 % (0.34 – 2.15 k/ul)	0 – 1 % (0 – 0.18 k/ul)	83.51 – 97.13 % (2.40 – 10.43 k/ul)	0 – 2.5 % (0 – 0.27 k/ul)	0 – 1 % (0 – 0.18 k/ul)	0 – 1 % (0 – 0.18 k/ul)	438 – 916

\*Medias con una letra en común en cada columna no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ) para la prueba de Tukey. T1 = SS (grupo control), T2 = CFF + SS, T3 = CFF + UT (100mg/kg), T4 = CFF + UT (200mg/kg).

La Tabla 4 muestra los promedios de la serie blanca al final del experimento; se visualiza leucopenia, linfopenia, monocitopenia, y trombocitopenia en T2, T3 y T4. El tratamiento T4 tuvo los valores más cercanos a los reportados inicialmente, sin cambios significativos con el tratamiento.

Tabla 4. Valores obtenidos en la serie blanca y plaquetaria después de la aplicación de los tratamientos.

Tratamientos	Parámetros							
	Leucocitos (k/ul)	N. segmentados (k/ul)	N. abastionados (k/ul)	Linfocitos (k/ul)	Monocitos (k/ul)	Eosinófilos (k/ul)	Basófilos (k/ul)	Plaquetas (u/l)
T1	8.60±1.70b	2.58±0.51b	0.00±0.00a	5.59±1.10b	0.34±0.07b	0.09±0.02b	0±0a	729.33±80.97a
T2	4.79±2.26a	1.44±0.68a	0.00±0.00a	3.11±1.47a	0.19±0.09a	0.05±0.02a	0±0a	602.00±135.83a
T3	4.88±2.59a	1.47±0.78a	0.00±0.00a	3.17±1.68a	0.20±0.10a	0.05±0.03a	0±0a	649.17±60.84a
T4	5.55±1.62a	1.67±0.49ab	0.00±0.00a	3.61±1.05ab	0.22±0.06ab	0.06±0.02ab	0±0a	672.00±111.53a
Valores Referenciales	2.88 – 10.74	5 – 20 % (0.34 – 2.15 k/ul)	0 – 1 % (0 – 0.18 k/ul)	83.51 – 97.13 % (2.40 – 10.43 k/ul)	0 – 2.5 % (0 – 0.27 k/ul)	0 – 1 % (0 – 0.18 k/ul)	0 – 1 % (0 – 0.18 k/ul)	438 – 916

\*Medias con una letra en común en cada columna no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ) para la prueba de Tukey. T1 = SS (grupo control), T2 = CFF + SS, T3 = CFF + UT (100mg/kg), T4 = CFF + UT (200mg/kg).

### Celularidad de órganos linfoides

Con respecto al bazo, no hubo cambios significativos entre los tratamientos; no obstante, se pudo observar que el tratamiento T4 obtuvo una mayor producción celular a comparación de los demás tratamientos (Tabla 5). Asimismo, al comparar las muestras obtenidas, se pudo visualizar un mayor número de células en las ratas que recibieron uña de gato (Figura 1).

Tabla 5. Conteo celular promedio del bazo según el tratamiento aplicado.

Células x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Valor Inicial	111.33a	118.89a	100.8a	125.85 <sup>a</sup>
Valor Final	97.87a	62.51a	95.28a	108.88 <sup>a</sup>

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) para la prueba de Tukey. T1 = SS (grupo control), T2 = CFF + SS, T3 = CFF + UT (100mg/kg), T4 = CFF + UT (200mg/kg).

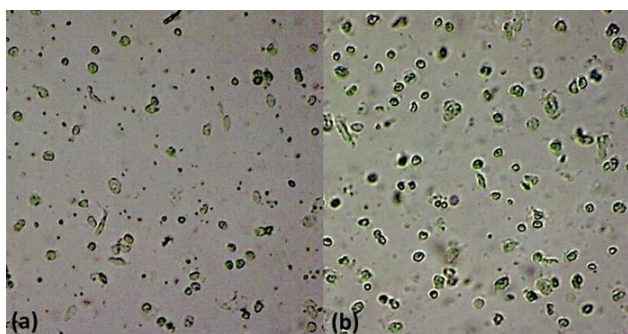


Figura 1. a. Muestra de bazo de rata inmunosuprimida con ciclofosfamida. b. Muestra de bazo de rata inmunosuprimida con ciclofosfamida e inmunoestimulada con uña de gato.

Por otro lado, los valores iniciales y finales de la celularidad de la médula ósea se pueden evidenciar en la Tabla 6; observándose que los ejemplares que recibieron el tratamiento T4 presentaron mayor celularidad a comparación de los otros tratamientos aplicados. De igual manera se puede visualizar las muestras de la médula ósea en la Figura 2.

Tabla 6. Conteo celular promedio de la médula ósea según el tratamiento aplicado.

Células x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Valor Inicial	23.52a	32.04a	21.75a	20.76a
Valor Final	31.12a	18.88a	22.69a	23.33a

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) para la prueba de Tukey. T1 = SS (grupo control), T2 = CFF + SS, T3 = CFF + UT (100mg/kg), T4 = CFF + UT (200mg/kg).

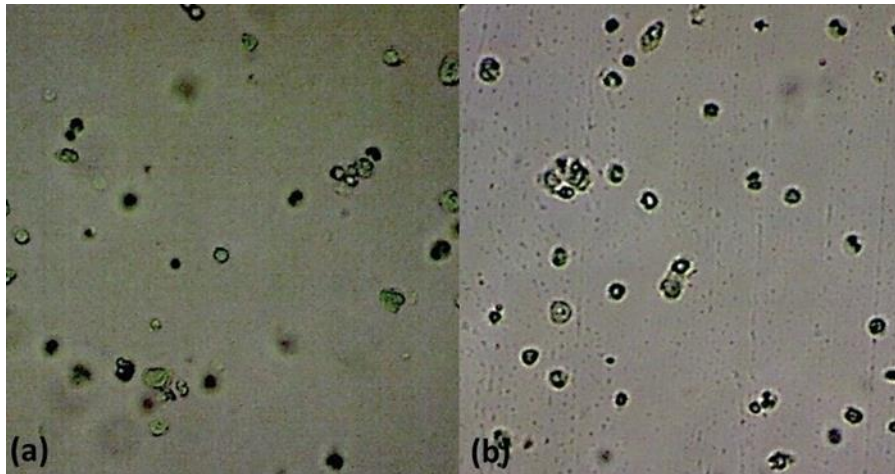


Figura 2. a. Muestra de médula ósea de rata inmunosuprimida con ciclofosfamida. b. Muestra de médula ósea de rata inmunosuprimida con ciclofosfamida e inmunoestimulada con uña de gato.

El último órgano analizado fue el timo, en el cual se evidenció un ligero incremento, no significativo, de los leucocitos a comparación de los valores obtenidos inicialmente (Tabla 7). A diferencia de los otros órganos, el grupo que fue sometido al tratamiento T3 obtuvo mejores resultados. Las muestras obtenidas del timo se pueden visualizar en la Figura 3.

Tabla 7. Conteo celular promedio del timo según el tratamiento aplicado.

Células x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Valor Inicial	44.67a	40.56a	44.25a	33.81 <sup>a</sup>
Valor Final	63.55a	26.27a	49.79a	40.99 <sup>a</sup>

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) para la prueba de Tukey. T1 = SS (grupo control), T2 = CFF + SS, T3 = CFF + UT (100mg/kg), T4 = CFF + UT (200mg/kg).

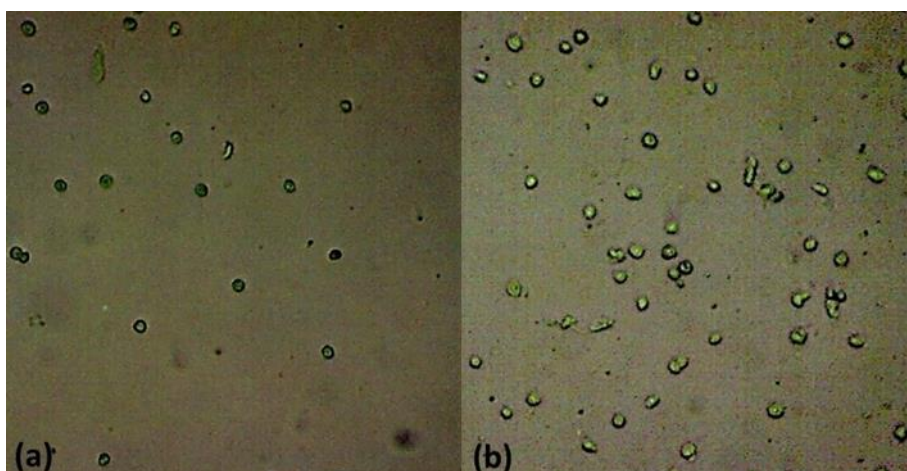


Figura 3. a. Muestra de timo de rata inmunosuprimida con ciclofosfamida. b. Muestra de timo de rata inmunosuprimida con ciclofosfamida e inmunoestimulada con uña de gato.



En resumen, respecto al bazo y médula ósea, el grupo que recibió el tratamiento T4 presentaron mejores resultados; mientras que, en cuanto al timo, se demostró que el tratamiento T3 fue el más eficaz (Figura 4).

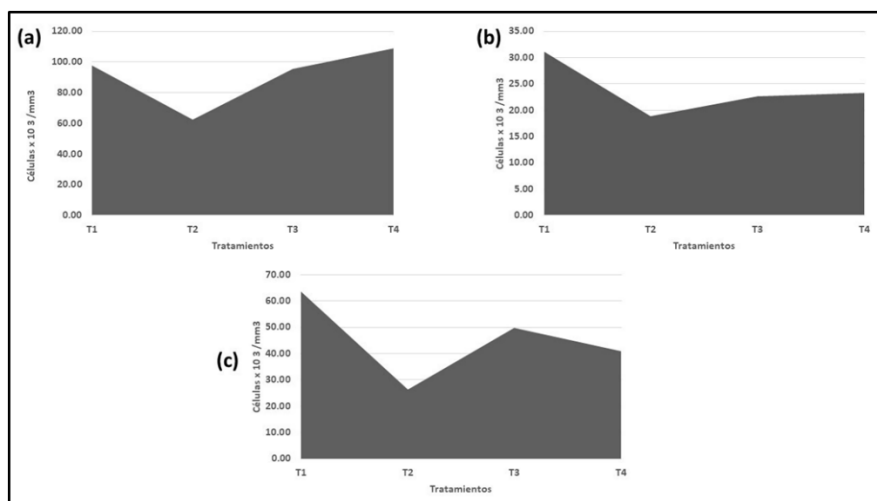


Figura 4. a. Conteo final promedio del bazo según el tratamiento recibido. b. Conteo final promedio de la médula ósea según el tratamiento recibido. c. Conteo final promedio del timo según el tratamiento recibido.

## Discusión

### Valores hematológicos

En cuanto a la serie roja, los valores obtenidos previo a la aplicación de los tratamientos se encontraban en su mayoría dentro de los parámetros referenciales establecidos (León et al., 2011). Se observó un aumento ligero del volumen corpuscular medio (VCM); no obstante, este hallazgo es frecuente cuando el animal se encuentra estresado (Hassan y Asim, 2020), por lo cual podría deberse al cambio de entorno que sufrieron los ejemplares. Con respecto a los valores finales, no se observaron cambios estadísticamente significativos; no obstante, se puede observar que las ratas del grupo T4 presentaron una ligera elevación de los eritrocitos. Se ha comprobado que el empleo de extractos de UT ejercen una función protectora en cuanto a los eritrocitos, debido a que inhibe el daño oxidativo, evitando la hemólisis (Bors et al., 2011). De igual manera, el efecto protector podría tener un efecto en los valores de la serie roja a largo plazo, ya que se ha demostrado que la UT aumenta los valores de la hemoglobina y hematocrito en pollos de engorde a los 43 días (Paredes et al., 2018). Por ello, es recomendable realizar investigaciones a largo plazo, para así evaluar los posibles efectos de la UT respecto a la serie roja.

Asimismo, los valores obtenidos dentro de la serie blanca y plaquetaria se situaban dentro de los rangos establecidos como normales previo a los tratamientos. Al hacer la comparación con los valores finales, se puede observar una disminución de la serie leucocitaria, siendo más marcada en los tratamientos T2, T3 y T4. En el grupo de tratamiento T1, se observó una ligera reducción de estos valores; a pesar de que los ejemplares no fueron

inmunosuprimidos con medicamentos, sí fueron administrados solución salina por vía intraperitoneal, lo cual requiere manipular al animal, generándole estrés y como consecuencia, una alteración en el sistema inmune (Viveros-Paredes et al., 2021). Por otro lado, los grupos de tratamientos que recibieron ciclofosfamida presentaron una reducción más notoria en los valores debido al efecto mielosupresor e inmunosupresor de este fármaco (Mundy et al., 2012).

Respecto a los valores de los leucocitos en sangre periférica, se obtuvo diferencias significativas en los tratamientos T1, T2 y T3. Respecto al T2 y T3, esta disminución se debe a la aplicación de ciclofosfamida; no obstante, el tratamiento T3 presentó valores ligeramente más elevados, debido a la administración de UT, sin embargo, al ser una dosis menor, no se obtuvieron valores cercanos al grupo control. Por otro lado, el T4 no mostró cambios significativos puesto que la aplicación de UT fue realizada a una dosis mayor (200mg/kg) y por ello, se observó un mejor efecto. Los hallazgos indican que la dosis de UT empleada y los valores de los leucocitos se relacionan de manera directamente proporcional, esto se puede corroborar con otra investigación, en la cual se administró UT a dosis de 15mg/kg, 75mg/kg y 150mg/kg, obteniendo un mayor incremento en los leucocitos según la dosis utilizada (Mendes et al., 2014). De igual manera se ha reportado que UT a una dosis de 300mg al día incrementa los leucocitos en pacientes sometidos a quimioterapias a base de fluorouracil, doxorubicina y ciclofosfamida (Araújo et al., 2012). Por ende, el uso de UT como un tratamiento adyuvante a distintos procedimientos que generan inmunosupresión, tales como las quimioterapias, podría ser factible.

La uña de gato contiene altas concentraciones de alcaloides tetra y pentacíclicos (Farias et al., 2011), siendo estos últimos los principales responsables del efecto inmunoestimulante debido a su acción mieloproliferativa (Pilarski et al., 2010). Debido a esto, mientras mayor sea la concentración de UT administrada, se obtendrá un mejor efecto sobre el sistema inmune, debido a las concentraciones de alcaloides pentacíclicos presentes en la tintura. De igual manera una investigación ha descrito que la concentración de los alcaloides incrementa según la altitud de la cual se obtiene la UT (Honório et al., 2017). Este hallazgo influiría dentro de esta investigación puesto que la tintura de UT fue obtenida del laboratorio Takiwasi, el cual se sitúa en la ciudad de Tarapoto, a una altura de 353 msnm.

Por otra parte, los valores de los neutrófilos también se vieron afectados después de la aplicación de los tratamientos; observando una disminución de los neutrófilos segmentados y la eliminación total de los neutrófilos abastados. Esta situación se debe a la aplicación de CFF, puesto que la aplicación de este agente alquilante genera inmunosupresión; se ha reportado que el recuento de neutrófilos se encuentra indetectable en el día 3 después de la aplicación de CFF, para posteriormente incrementar de manera ligera, situándose en valores por debajo de lo normal en el día 8 (Park et al., 2012). No obstante, en los grupos T3 y T4 se evidenció un aumento ligero de los neutrófilos segmentados en comparación con el grupo T2. De manera similar a los leucocitos, se pudo observar que el T4 tuvo mejor acción sobre los valores de neutrófilos. Este hallazgo indica que la UT puede ser útil en la prevención de enfermedades, debido a que incrementa la cantidad de neutrófilos, los cuales ejercen la función de primera línea de defensa ante el ingreso de un patógeno; asimismo, existe un reporte en el

cual se administró UT a dosis de 75, 150, 300 y 400 mg/kg-1 en la dieta de *Oreochromis niloticus*, posteriormente fueron inoculados con *Streptococcus agalactiae*, observando una mejor respuesta inmune e incremento de neutrófilos según la dosis aplicada (Yunis-Aguinaga et al., 2015).

El incremento de linfocitos fue otro hallazgo observado en esta investigación, a pesar de que no se observaron diferencias significativas, siendo más marcado en aquellos ejemplares que fueron sometidos al T4. Asimismo, se ha demostrado que el uso de UT a una dosis de 120mg/kg en ratas que recibieron una sustancia inmunotóxica, como el fipronil, incrementa el recuento de linfocitos en sangre después de un plazo de 30 días (Aldayel et al., 2021). Del mismo modo, otra investigación reportó el aumento de linfocitos en ratas luego de la administración de uña de gato durante 90 días, siendo la dosis-dependientes (Mendes et al., 2014). Se conoce que la UT estimula la liberación de IL-6, pudiendo generar una proliferación de progenitores mieloides (Farias et al., 2011), y así aumentar la cantidad de linfocitos en circulación; además, la IL-6 también desempeña un rol con respecto a la proliferación y diferenciación de los linfocitos (Hartman y Frishman, 2014). Por otro lado, la IL-1 también se ve estimulado por la uña de gato (Allen-Hall et al., 2010). Esta interleucina incrementa la proliferación de linfocitos T, puesto que interviene en el proceso de la linfopoyesis y promueve la formación de progenitores mieloides (Kennedy y Knight, 2015).

Respecto a los monocitos se pudo observar que los tratamientos T3 y T4 logaron un aumento ligero, sin embargo, no se obtuvieron cambios significativos. Esto difiere con otra investigación similar, en la cual la UT generó una disminución de los monocitos luego de ser administrada durante 30 días (Aldayel et al., 2021); un factor importante que pudo generar esta discrepancia es la duración del tratamiento, puesto que es posible que la UT genere un aumento de monocitos a corto plazo; mientras que, a largo plazo no tenga efecto sobre estas células, o cause la disminución de ellas. Asimismo, la administración de UT durante 90 días a dosis de 15mg/kg, 75mg/kg y 150mg/kg no genera cambios significativos entre los parámetros obtenidos de los monocitos (Mendes et al., 2014). Por otra parte, el alcaloide isopteropodine se encuentra presente en la uña de gato (Wahid et al., 2014), y aumenta la activación y fagocitosis por parte de los macrófagos, pudiendo genera un aumento de la migración de los monocitos hacia los tejidos y teniendo como consecuencia una disminución de sus valores en sangre.

Con respecto a los valores obtenidos de los eosinófilos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Este hallazgo coincide con otras investigaciones, en las cuales no hubo cambios relevantes en el recuento total de eosinófilos después de la administración de UT durante 30 y 90 días con distintas dosis, variando desde 15mg/kg hasta 150 mg/kg (Mendes et al., 2014; y Aldayel et al., 2021). Por lo tanto, no existe evidencia que la uña de gato afecte la producción de eosinófilos, ya sea a corto o largo plazo, y a dosis bajas o elevadas.

De igual manera, no se observaron cambios en el nivel de basófilos, manteniéndose en el límite inferior. Esta situación se asemeja a otro estudio, en el cual los valores de basófilos se mantuvieron nulos después de la aplicación de UT durante 3 meses (Mendes et al., 2014). No obstante, difiere de otro reporte en el que se halló una disminución ligera de basófilos con un

extracto de UT (Aldayel et al., 2021); por ello, es posible que la UT disminuya los valores de los basófilos. Un factor importante a tomar en cuenta al momento de interpretar los resultados son los valores iniciales, ya que en aquellos estudios donde no se reportaron cambios, estos valores eran nulos anteriormente a la aplicación de UT, sin embargo, se requieren más estudios respecto a este tema.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas respecto a los valores plaquetarios; sin embargo, se puede evidenciar que, aquellos ejemplares que recibieron UT presentaron una disminución en plaquetas a comparación de los valores iniciales. Del mismo modo, el uso de uña de gato como adyuvante en pacientes que fueron sometidos a múltiples ciclos de quimioterapia también causó un descenso en el nivel de plaquetas (Farias et al., 2012). Se ha reportado que distintos extractos de uña de gato presentan una acción antiplaquetaria *in vitro*, no se conoce el mecanismo exacto de este suceso, pero se postula que los alcaloides presentes en la UT intervienen en este hallazgo (Kolodziejczyk-Czepas et al., 2020). Por ende, se requiere realizar más investigaciones respecto a la capacidad antiplaquetaria, para así determinar la dosis idónea o establecer contraindicaciones, especialmente en aquellos pacientes que presentan enfermedades que causan trombocitopenia, tales como la ehrlichiosis canina.

#### Celularidad de los órganos linfoides

Los valores finales de la celularidad del bazo se encontraron disminuidos al compararlos con los valores iniciales; de igual manera, se pudo observar una disminución de la celularidad en el grupo T1, los cuales fueron administrados solución salina, componente que no tiene efecto sobre la celularidad. Sin embargo, la reducción de células puede deberse al estrés presente durante la manipulación, puesto que se ha demostrado que este factor genera una disminución de la celularidad y tamaño del bazo, produciendo una inmunosupresión (Bagwill et al., 2016). El descenso en los grupos restantes (T2, T3, T4) se debe principalmente a la administración de CFF, hallazgo que se ha reportado en otra investigación, donde se observó un deterioro de celularidad en el bazo, después de la aplicación de CFF a una dosis de 10 mg/kg por día durante un mes (Senin et al., 2018). Por otra parte, se pudo determinar que ambos grupos que recibieron la tintura de uña de gato presentaron una mayor cantidad de células; del mismo modo, el grupo T4 presentó una celularidad más elevada que el grupo control, comprobando el efecto inmunoestimulante de la UT. El incremento de celularidad del bazo puede tener diversos efectos, puesto que, es un órgano auxiliar en el proceso hematopoyético cuando existe un daño en la médula ósea y no se puede abastecer la demanda (Hann et al., 2012). Por ello, es importante destacar el efecto inmunoproliferativo de la tintura de uña de gato y el rol que desempeña el bazo durante proceso inmunosupresores.

Respecto a la médula ósea, existe una desigualdad en los valores iniciales; sin embargo, el T3 y T4 mostraron un incremento de la celularidad al compararlos con estos valores. La administración de UT a dosis de 15mg/kg, 75mg/kg y 150mg/kg no generó efecto en la celularidad luego de la administración de 90 días (Mendes et al., 2014). Por ello, la acción de la uña de gato sobre la médula ósea podría ser dosis-dependiente. Asimismo, la población de linfocitos se puede encontrar elevada en la médula ósea, debido a que en este órgano se originan

a partir de células precursoras (Calderón et al., 2020). Este incremento se puede atribuir a la concentración de alcaloides pentacíclicos presentes en la tintura (Farias et al., 2011).

Por último, se pudo evidenciar un incremento en la celularidad del timo en aquellos grupos que recibieron UT, siendo más marcado en el T3. Del mismo modo, se ha reportado un aumento en las células del timo al administrar un extracto de uña de gato durante tres meses (Mendes et al., 2014). Este órgano tiene un alta capacidad de producción de linfocitos T (Ge y Zhao, 2012) y, además, presenta una alta concentración de linfocitos en desarrollo en la corteza (Aldayel et al., 2021). No obstante, conforme avanza la edad del animal, el timo se empieza a atrofiar y disminuye su funcionalidad (Rezzani et al., 2013). La estimulación de IL-6 causada por la uña de gato (Farias et al., 2011; Hartman y Frishman, 2014) genera una mayor migración de linfocitos desde la médula ósea al timo para la diferenciación de ellos, incrementando así la celularidad de dicho órgano. En cuanto a los valores de la T4, no se observó el mismo efecto que el T3, esto se puede deber a una involución temprana del timo en los ejemplares pertenecientes al T4 (Barbouti et al., 2020).

### **Conclusión**

El empleo la tintura de UT a una dosis de 100mg/kg y 200mg/kg no presenta efecto sobre los valores de la serie roja. Con respecto a la serie blanca, se puede evidenciar el efecto inmunoestimulante en los valores de neutrófilos y linfocitos, elevando sus valores; asimismo, se comprobó que la dosis más alta (200mg/kg) fue la más eficaz. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en los valores de plaquetas, se pudo observar una disminución ligera; por ello es importante realizar más investigaciones para determinar el mecanismo por el cual se da la acción antiplaquetaria. Por último, la uña de gato también aumenta la celularidad en los órganos observados (bazo, timo y médula ósea), revertiendo la inmunosupresión generada. De igual manera se pudo determinar que la dosis de 200mg/kg obtuvo mejores resultados.

### **Conflictos De Interés**

Los autores de la presente investigación declaran que no existen conflictos de interés.

### **Referencias**

- [1] Fishman, J. 2013. Opportunistic Infections—Coming to the Limits of Immunosuppression?. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, USA. 3(10):a015669.
- [2] Chiu, L., Li, J., Lhermie, G., Cazer, C. 2021. Analysis of the demand for pet insurance among uninsured pet owners in the United States. Veterinary Record, USA. 189(1):e243.
- [3] Belshaw, Z., Yeates, J. 2018. Assessment of quality of life and chronic pain in dogs. The Veterinary Journal, United Kingdom. 239:59-64.
- [4] Calvo, A., Dévényi, D., Kószó, B., Sanz, S., Oelbermann, A., Maier, M., Keve, T., Komka, K., Gamse, T., Weidner, D., Székely, E. 2017. Controlling concentration of bioactive components in cat's claw based products with a hybrid separation process. Journal of Supercritical Fluids, Hungary. 125:50-55.
- [5] Gregory, J., Vengalasetti, Y., Bredesen, D., Rao, R. 2021. Neuroprotective Herbs for the Management of Alzheimer's Disease. Biomolecules, USA. 11(4):543-561.

- [6] Zhu, X., Li, Q., Song, W., Peng, X., Zhao, R. 2021. P2X7 receptor: a critical regulator and potential target for breast cancer. *Journal of Molecular Medicine, China*. 99(3):349-358.
- [7] Batiha, g., Beshbishy, A., Wasef, L., Elewa, Y., El-Hack, M., Taha, A., Al-Sagheer, A., Devkota, H., Tufarelli, V. 2020. *Uncaria tomentosa* (Willd. Ex Schult.) DC.: A Review on Chemical Constituents and Biological Activities. *Applied Sciences, Japan*. 10(8):2668-2680.
- [8] Francisco, V., Liberal, J., Ferreira, J., Costa, G., Lopes, M., García-Rodríguez, C., Cruz, M., Batista, M. 2012. Immunostimulant activity of *Uncaria tomentosa* and its tannins. *Planta Medica, USA*.
- [9] Instituto Nacional de Salud. 2012. Manual de Procedimientos para el Uso de Animales de Laboratorio. [En línea]: Instituto Nacional de Salud, ([https://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/RJ\\_Y\\_MANUAL\\_DE\\_PROCEDIMIENTOS\\_CIEA\\_1.pdf](https://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/RJ_Y_MANUAL_DE_PROCEDIMIENTOS_CIEA_1.pdf), 10 Dic. 2021).
- [10] Academia Nacional de Medicina. 1999. Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. [En línea]: Academia Nacional de Medicina (<https://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/Guide%20for%20the%20care%20and%20use%20Spa%201999.pdf>, 10 Dic 2021).
- [11] León, G., Blanco, D., Peña, A., Ronda, M., Gonzáles, B., Arteaga, M., Bada, A., González, Y., Mancebo, A. 2011. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB. *Revista Electrónica de Veterinaria, España*. 12(11):1-10.
- [12] Hassan, A., Asim, R. 2020. Effect of vitamin C and acetylsalicylic acid supplementation on some hematological value, heat shock protein 70 concentration and growth hormone level in broiler exposed to heat stress. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Iraq*. 34(2):357-363.
- [13] Bors, M., Bukowska, B., Pilarski, R., Gulewicz, K., Oszmiański, J., Michałowicz, J., Koter-Michalak, M. 2011. Protective activity of the *Uncaria tomentosa* extracts on human erythrocytes in oxidative stress induced by 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and catechol. *Food and Chemical Toxicology, Poland*. 49(9):2202-2211.
- [14] Paredes, D., Robles, R., Sandoval, C., Sandoval, M. 2018. Effect of *Uncaria tomentosa* aqueous extract on biochemical and hematological profiles and live performance parameters in broiler chickens. *Livestock Research for Rural Development, Peru*. 30(5):78.
- [15] Viveros-Paredes, J., Puebla-Pérez, A., Gutiérrez-Coronado, O., Macías-Lamas, M., Hernández-Flores, G., Ortiz-Lazareno, P., Bravo-Cuéllar, A., Villaseñor-García, M. 2021. Capsaicin attenuates immunosuppression induced by chronic stress in BALB/C mice. *International Immunopharmacology, Mexico*. 93:107341.
- [16] Mundy, P., Silva, E., Ledbetter, E. 2012. Effects of cyclophosphamide myelosuppression in adult dogs with latent canine herpesvirus-1 infection. *Veterinary Microbiology, USA*. 159(1-2):230-235.
- [17] Mendes, P., Ponce, F., Fraga, D., Pípole, F., Perazzo, F., Hueza, I. 2014. High doses of *Uncaria tomentosa* (cat's claw) reduce blood glucose levels in rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Brazil*. 6(2):410-415.
- [18] Araújo, M., Farias, I., Gutierrez, J., Dalmora, S., Flores, N., Farias, J., Cruz, I., Chiesa, J., Morsch, V., Schetinger, M. 2012. *Uncaria tomentosa*—Adjuvant Treatment for Breast Cancer: Clinical Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Brazil*. 2012:676984.

- [19] Farias, I., Araújo, M., Zimmerman, E., Dalmora, S., Benedetti, A., Alvarez-Silva, M., Asbahr, A., Bertol G., Farias, J., Schetinger, M. 2011. *Uncaria tomentosa* stimulates the proliferation of myeloid progenitor cells. *Journal of Ethnopharmacology, Brazil*. 137(1):856-863.
- [20] Pilarski, R., Filip, B., Wietrzyk, J., Kurás, M., Gulewicz, K. 2010. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine, Poland*. 17(14):1133-1139.
- [21] Honório, I., Bertoni, B., Telles, M., Braga, R., França, S., Coppede, J., Correa, V., Filho, J., Pereira, A. 2017. Genetic and chemical diversity of *Uncaria tomentosa* (Willd. ex. Schult.) DC. in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE, Brazil*. 12(5):e0177103.
- [22] Park, S., Liao, J., Berry, J., Li, X., Koh, A., Michalski, M., Eber, M., Soki, F., Sadler, D., Sud, S., Tisdelle, S., Daignault, S., Nemeth, J., Snyder, L., Wronski, T., Pienta, K., McCauley, L. 2012. Cyclophosphamide Creates a Receptive Microenvironment for Prostate Cancer Skeletal Metastasis. *Cancer Research, USA*. 72(10):2522-2532.
- [23] Yunis-Aguinaga, J., Claudiano, G., Marcusso, P., Manrique, W., Moraes, J., Moraes, E., Fernandes, J. 2015. *Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology, Brazil*. 47(1):630-638.
- [24] Aldayel, T., Abdel-Rahman, H., El-Hak, G., Abdelrazek, A., Mohamed, R., El-Sayed, R. 2021. Assessment of modulatory activity of *Uncaria tomentosa* extract against fipronil immunotoxicity in male rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety, Saudi Arabia*. 224:112674.
- [25] Hartman, J., Frishman, W. 2014. Inflammation and Atherosclerosis: A Review of the Role of Interleukin-6 in the Development of Atherosclerosis and the Potential for Targeted Drug Therapy. *Cardiology in Review, USA*. 22(3):147-151.
- [26] Allen-Hall, L., Arnason, J., Cano, P., Lafrenie, R. 2010. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- $\alpha$  inhibitor through NF- $\kappa$ B. *Journal of Ethnopharmacology, Canada*. 127(3):685-693.
- [27] Kennedy, D., Knight, K. 2015. Inhibition of B Lymphopoiesis by Adipocytes and IL-1–Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology, USA*. 195(6):2666-2674.
- [28] Wahid, N., Noor, Z., Khamis, S., Ahmad, R. 2014. Constituents from the Stems of Malaysian *Uncaria tomentosa*. *The Open Conference Proceedings Journal, Malaysia*. 4(1):88-92.
- [29] Kolodziejczyk-Czepas, J., Ponczek, M., Sady-Janczak, S., Pilarski, M., Bukowska, B. 2020. Extracts from *Uncaria tomentosa* as antiplatelet agents and thrombin inhibitors – the in vitro and in silico study. *Journal of Ethnopharmacology, Poland*. 267:113494.
- [30] Bagwill, A., Lovern, M., Worthington, T., Smith, L., McMurry, S. 2016. Effects of Water Loss on New Mexico Spadefoot Toad (*Spea multiplicata*) Development, Spleen Cellularity, and Corticosterone Levels. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 325(8):548-561.
- [31] Senin, M., Al-Ani, I., Mahmud, M., Muhammad, N., Kasmuri, H. 2016. Protective Effect of Virgin Coconut Oil on Cyclophosphamide-induced Histological Changes in Lymphoid Tissues. *International Medical Journal Malaysia, Malaysia*. 17(3):65-74.
- [32] Hann, J., Mebius, R., Kraal, G. 2012. Stromal cells of the mouse spleen. *Frontiers in Immunology, Netherlands*. 12(3):201.

- [33] Calderón, E., Espinoza, B., Li, O., Barrios-Arpi, M. 2020. Caracterización citológica de la médula ósea durante el desarrollo fetal en la alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, Perú. 31(3):e18156.
- [34] Ge, L., Zhao, Y. 2012. Evolution of thymus organogenesis. *Developmental and Comparative Immunology*, China. 39(1-2):85-90.
- [35] Rezzani, R., Nardo, L., Favero, G., Peroni, M., Rodella, L. 2013. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. *AGE*, USA. 36(1):313-351.
- [36] Barbouti, A., Vasileiou, P., Evangelou, K., Vlasis, K., Papoudou-Bai, A., Gorgoulis, V., Kanavaros, P. 2020. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Greece. 2020:1-14.