
Antinocicepción opioide del extracto metanólico del Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*) en un modelo de dolor visceral en ratón

ANTINOCICEPTIVE OPIOID OF CHUCHUHUASI (*Maytenus krukovii*) METHANOLIC EXTRACT
IN A MODEL OF VISCERAL PAIN IN MICE

Salazar, A.¹; Santa María, J.¹; Zimic, C.²; Salinas, I.²; Sánchez, L.²; Arrambide, J.²; Zapater, L.²; Arias, M.²; Ulffe, G.²; Páucar, R.²; Lucy Ibáñez V.³; Benjamín Castañeda C.⁴

RESUMEN

Evaluamos la acción antinociceptiva del extracto metanólico del Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*), al 20%, administrado por vía oral, en ratones albinos, machos, raza Webster Suizo obtenidos del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Ministerio de Salud del Perú, utilizando un modelo de dolor visceral, mediante la administración de ácido acético al 2%, vía intraperitoneal, a la dosis de 0,05 ml/10g de peso. Observamos una disminución del 50% del número de contorsiones abdominales, en relación al grupo control, sin prolongación del período de latencia de las mismas. El efecto analgésico observado, fue bloqueado por la naloxona, lo que sugeriría la participación de receptores opioides, o de opioides endógenos en el mecanismo de la acción analgésica. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el programa estadístico SPSS versión 11.5.

PALABRAS CLAVE

Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*), ácido acético, antinocicepción, contorsiones abdominales, naloxona, extracto metanólico.

ABSTRACT

We evaluated the antinociceptive action of a 20% Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*) methanolic extract administered by oral route, on male albino Swiss Webster mice, from the Peruvian Health Institute, using a model of visceral pain. Intraperitoneal injections of 2% acetic acid at a concentration of 0,05 ml/10g were administered. We found a decrease of 50% in the average number of

abdominal cramps, related to the control group, without increase of the latency period of abdominal contortions. The analgesic action was blocked by naloxone and could imply the participation of opioid receptors or endogenous opioids as the mechanism of action. Data were analyzed statistically with the SPSS program version 11.5.

KEY WORDS

Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*); acetic acid; antinociception; abdominal cramps; naloxone; methanolic extract.

INTRODUCCIÓN

El Perú, localizado en el área subtropical de Sudamérica, debería presentar un clima cálido y húmedo, pero debido a la Cordillera Andina, a las corrientes marinas, y al flujo de masas de aire, se genera una rica variedad climática, geológica y ecológica; características que nos ubica, en uno de los cinco países con mega biodiversidad del mundo; con gran potencial para su desarrollo y uso directo de sus inmensos recursos, como alimentación, medicinas, construcción, entre otros^{1,2}.

Parte de la biodiversidad son las plantas, un gran número de ellas, son utilizadas con fines medicinales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), se calcula que las dos terceras partes de la población mundial (4000 millones de personas), recurren al uso de plantas con fines medicinales. En el Perú, se utiliza, empíricamente, alrededor de 1400 especies de plantas con fines medicinales, cuyo uso popular se registra durante miles de años^{1,2}.

1 M.D., Egresado de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Lima – Perú.

2 Alumno de Tercer Año de Medicina, Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Lima – Perú.

3 Ph.D., Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Lima – Perú.

4 Ph.D., M.D, Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres. Lima – Perú.

Chuchuhuasi (*Maytenus Krukovii*), es un árbol que crece en la amazonía de nuestro territorio; folclóricamente es usado como planta medicinal, desde la época del antiguo Perú; se le atribuye propiedades antiinflamatorias, analgésicas, diuréticas y afrodisíacas^{3,4,5,6}; además, esta especie cuenta con estudios científicos sobre aspectos fitoquímicos, toxicidad aguda, gastroprotección, actividad analgésica, antiinflamatoria, e hipotensora^{7,8,9}; sobre otras especies de *Maytenus*; existen investigaciones, con resultados diferentes, desde la marcha fitoquímica, hasta la toxicidad, la actividad antipirética y los efectos farmacológicos sobre la presión arterial^{10,11,12,13,14}.

Primariamente, se atribuyó la acción analgésica de los opioides, a la activación de receptores, exclusivamente, en el sistema nervioso central (Reisina y Pasternak, 1996)¹⁵. En los últimos 15 años, gran número de estudios han caracterizado potentes acciones periféricas de los opioides, principalmente en el tejido inflamado (Antonijevic et al, 1995)^{16,17}. Se han encontrado receptores opioides (μ , δ , κ) en fibras nerviosas sensoriales y simpáticas de piel y articulaciones, en los plexos submucosos del intestino, vejiga urinaria, en conductos deferentes, en leucocitos, etc., con efectos opioide-receptor-específicos (Barber y Gottschlich, 1992, Stein, 1998)^{16,18,19}.

Conocemos, por investigaciones previas, que *Maytenus Krukovii* posee, cualitativamente, una gran cantidad de alcaloides, además de una actividad antinociceptiva comprobada por Lengua L. y Liu H., en dosis de 1000 mg./Kg. en modelo experimental de dolor visceral^{7,8}; y ante la evidencia de la intermediación de receptores opioides para la antinocicepción, en este modelo de dolor visceral^{17,18,19}; nuestro objetivo fue evaluar la acción antinociceptiva del Chuchuhuasi, en el modelo de dolor visceral (contracciones abdominales por ácido acético) descrito por Siegnund y col, en 1957²⁰, como Collier y col en 1968²¹, con el propósito de contribuir a la dilucidación de los posibles mecanismos involucrados en la acción analgésica y la posible participación de receptores opioides; para posteriormente, confirmados los resultados, y agotados los estudios pre-clínicos, preparar una presentación farmacéutica, a fin de iniciar estudios de fase clínica.

MATERIAL Y MÉTODO

Material vegetal

Se Utilizó, corteza del Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*), la cual fue provista por el Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (FMH-USMP).

Material animal

Se utilizaron 32 ratones machos albinos, raza Webster Suizo obtenidos del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Ministerio de Salud del Perú, cuyos pesos promedios fueron de 28 g, los mismos que fueron aclimatados en las instalaciones del bioterio de la FMH-USMP.

Preparación del extracto metanólico

El extracto, se preparó a partir del material seco y molido de la corteza del Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*); se maceró durante una semana en metanol al 20%, posteriormente la mixtura fue filtrada y secada a temperatura ambiente, por un periodo de 48 horas, hasta obtener un polvo muy fino, el cual se almacenó en envases herméticos para su posterior disolución en NaCl al 9% y preparación de las diferentes concentraciones, requeridas en los experimentos del presente estudio. Adicionalmente, y con fines de control de esterilidad microbiológica del extracto, se realizó un tamizaje microbiológico en el Centro de Investigación de Microbiología y Parasitología de la FMH-USMP.

Modelo de dolor visceral por ácido acético

La prueba nociceptiva utilizada fue una modificación de la prueba de contorsiones abdominales (Siegnund y col, 1957, Collier y col, 1968)^{20,21}. Cada animal recibió una inyección, vía intraperitoneal (i.p.), de 0,05 ml./10g. de peso, de ácido acético al 1% en suero fisiológico, para provocar contorsiones abdominales. Los animales fueron colocados, por separado, en jaulas metálicas para observar y contar el número de contorsiones abdominales. Las contorsiones abdominales se definieron como una distensión exagerada del abdomen, combinadas con el estiramiento de las patas traseras. Se registró el número total de calambres (contorsiones) durante los 20 minutos siguientes a la inyección de ácido acético.

Ética en animales de experimentación

Se trabajó bajo las recomendaciones internacionales de 41ª Asamblea Médica Mundial de Hong Kong.

Diseño experimental

Se conformaron 04 grupos de 08 ratones cada uno: (a) Grupo N° 01 (Control), se les administró ácido acético al 1%, vía i.p., a dosis de 0,05 ml./10g. de peso. (b) Grupo N° 02 (tratado con Chuchuhuasi + ácido acético), se les administró extracto metanólico de Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*) vía oral, a dosis de 1000 mg/kg de peso, y 60 minutos después se aplicó ácido acético al 1%, vía i.p. (c) Grupo N° 03 (tratado con Chuchuhuasi + clorhidrato de naloxona + ácido acético) se les administró extracto metanólico de Chuchuhuasi

(*Maytenus krukovii*) vía oral, 40 minutos después se aplicó clorhidrato de naloxona por vía subcutánea (s.c.) a dosis de 10 mg./Kg. de peso; 20 minutos después se administró ácido acético al 1%. (d) Grupo N° 04 (Modelo de entrenamiento), se les administró ácido acético al 1%, vía i.p.

Análisis de resultados

Según el diseño de tipo aleatorio y considerados los datos obtenidos, los resultados se expresaron como medias +/- desviación estándar para las variables cuantitativas, y proporciones más frecuencias para las cualitativas, utilizándose el programa estadístico SPSS versión 11.5 para Windows.

RESULTADOS

Grupo N° 01 (Modelo Control)

La media obtenida del periodo de latencia después de la aplicación del ácido acético a la dosis referida, fue de 6,38 minutos, con una desviación estándar (DS) de 4,07; siendo el tiempo mínimo de latencia de 03 minutos y el máximo de 15 minutos (Tabla N° 01). La media obtenida del número de contorsiones durante 20 minutos, después de la aparición de las mismas, fue de 44,75 con DS de 10,29 y un rango entre 34 y 60 contorsiones (Tabla N° 02). Se consideró en este grupo, estas dos variables (periodo de latencia y número de contorsiones abdominales) como 100%, para la comparación con los siguientes grupos experimentales (Ver Tabla N° 01 y Tabla N° 02).

Grupo N° 02 (Modelo Chuchuhuasi + ácido acético)

El periodo de latencia fue de 4,88 minutos, con una DS de 1,13 y un rango entre 03 y 07 minutos (Tabla N° 01). El promedio del número de contorsiones fue de 21,63 con DS de 2,88 y un rango entre 17 y 25 contorsiones (Tabla N° 02).

Grupo N° 03 (Modelo Chuchuhuasi + clorhidrato de naloxona + ácido acético)

La media obtenida del periodo de latencia fue de 6,13 minutos, con una DS de 2,23 y un rango entre 04 y 10 minutos (Tabla N° 01). El promedio de contorsiones abdominales fue de 46,25, con DS de 11,78 y un rango entre 39 y 75 contorsiones (Tabla N° 02).

Comparación entre los grupos

En relación al periodo de latencia fue similar para el Grupo N° 02 (4,88 minutos con DS de 1,13) y el Grupo N° 03 (6,13 minutos con DS de 2,23), respecto al Grupo N° 01, modelo control (6,38 minutos, DS de 4,07), (Tabla N° 01 y Figura N° 01).

En relación a las contorsiones abdominales fue diferente para el Grupo N° 02 (21,63 con DS de 2,88) y Grupo N° 03 (46,25 con DS de 11,78) y respecto al Grupo N° 01, modelo control (44,75 con DS de 10,29), (Tabla N° 02 y Figura N° 02), notándose una disminución de las contorsiones en un 51,67% del Grupo N° 02, en relación al Grupo N° 01; y una igualdad del Grupo N° 03, en relación al Grupo N° 01.

Tabla N° 01

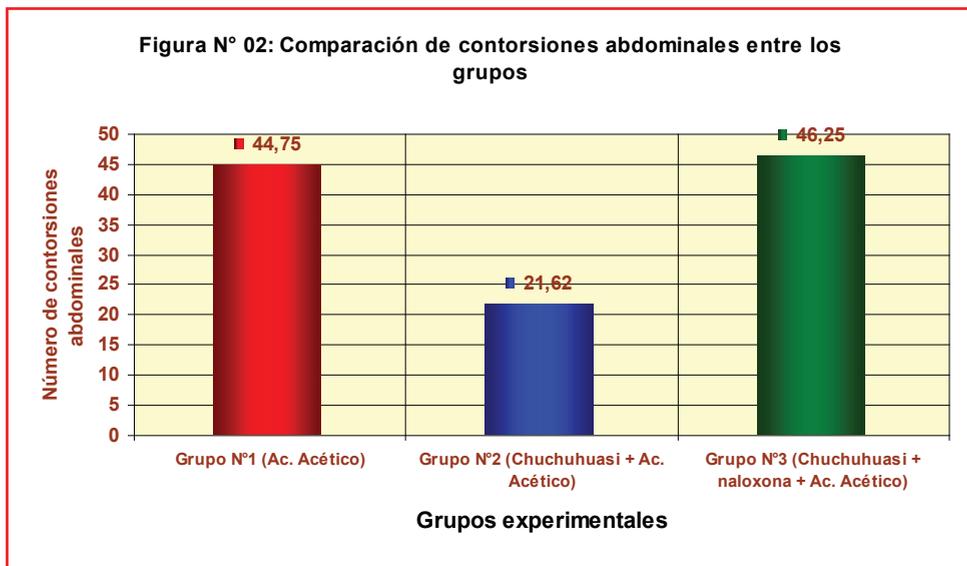
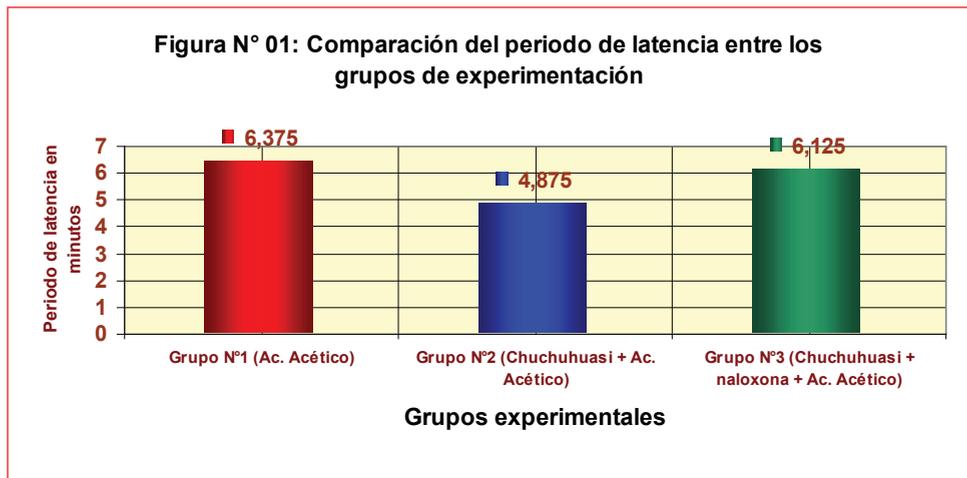
Periodo de latencia en minutos (PL), de los grupos experimentales

| PL – Grupos | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. |
|--|---|--------|--------|-------|------------|
| Grupo N° 01 (Ac. Acético) | 8 | 3 | 15 | 6,38 | 4,07 |
| Grupo N° 02 (Chuchuhuasi + Ac. Acético) | 8 | 3 | 7 | 4,88 | 1,13 |
| Grupo N° 03 (Chuchuhuasi + naloxona + Ac. Acético) | 8 | 4 | 10 | 6,13 | 2,23 |

Tabla N° 02

Número de contorsiones abdominales (CA), de los grupos experimentales

| CA – Grupos | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. |
|--|---|--------|--------|-------|------------|
| Grupo N° 01 (Ac. Acético) | 8 | 34 | 60 | 44,75 | 10,29 |
| Grupo N° 02 (Chuchuhuasi + Ac. Acético) | 8 | 17 | 25 | 21,63 | 2,88 |
| Grupo N° 03 (Chuchuhuasi + naloxona + Ac. Acético) | 8 | 39 | 75 | 46,25 | 11,78 |



DISCUSIÓN

Estudios anteriores, realizados con Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*), concluyen en la presencia de actividad analgésica, en este modelo de dolor visceral en ratón, y que ésta se evidencia por la prolongación del periodo de latencia (PL), y la disminución del número de contorsiones abdominales, debiendo considerar que la acción analgésica puede manifestarse por prolongación del periodo de latencia o por disminución de las contorsiones, o ambos efectos a la vez^{7,8}. Los hallazgos del presente trabajo, nos demuestran una clara disminución del número de contorsiones o contracciones abdominales, las mismas que se redujeron en más del 50%. La acción antinociceptiva del Chuchuhuasi, según nuestros resultados, di-

fiere de los mencionados anteriormente, porque, apreciamos una leve disminución; que desde el punto de vista práctico nos indicaría que no hubo variación del periodo de latencia, pero que no invalida el efecto antinociceptivo evidenciado por la reducción significativa del número de contorsiones abdominales; nuevos ensayos dilucidarán al respecto.

Un aspecto, sumamente, interesante del presente trabajo, nos parece el hecho que el clorhidrato de naloxona, prácticamente, anuló el efecto antinociceptivo del Chuchuhuasi, al restituir el 100% del número de contorsiones abdominales; si consideramos que el clorhidrato de naloxona es un antagonista competitivo puro de receptores opioides que atraviesa la barrera hematoencefálica, ejerciendo su efecto a nivel cen-

tral y periférico^{18,19}, podemos plantear la hipótesis de que la acción analgésica del Chuchuhuasi, se ejerce a través de los receptores opioides, ya sea por acción directa o por liberación de opioides endógenos, que en última instancia activarían los receptores opioides. La actividad antinociceptiva de *Maytenus krukovii*, podría deberse a la acción de alguno de sus componentes fitoquímicos, sobre los receptores opioides y la subsiguiente activación de los mismos, ya sea a nivel central o periférico.

Existen, en la actualidad, compuestos cuaternarios, bloqueantes de los receptores opioides, como el metioduro de naloxona, de Research Biochemicals, sustancia, que tiene la particularidad de no cruzar la barrera hematoencefalica¹⁸. El uso de este tipo de bloqueadores de receptores opioides, en el futuro, nos dará mayores luces acerca del nivel de acción del Chuchuhuasi.

Así mismo, el *Maytenus krukovii*, como se ha demostrado en estudios previos, posee una gran cantidad de alcaloides, además de una serie de otros metabolitos como flavonoides, taninos, etc. En el presente trabajo, utilizamos el extracto total de la corteza del Chuchuhuasi, por lo que no existe la certeza de que sean los alcaloides, los únicos responsables de la acción antinociceptiva; puesto que administramos la mezcla de todos los componentes fitoquímicos de la planta. De otro lado, existen antecedentes de actividad analgésica de otros componentes fitoquímicos, como por ejemplo los flavonoides^{22,23,24,25}, por lo tanto, en el futuro, será adecuado explorar de manera individual el efecto analgésico y mecanismo de acción de cada uno de los componentes fitoquímicos del Chuchuhuasi, con la intención de elucidar él o los componentes responsables de la acción analgésica, y, partiendo de éstas, agotando los estudios pre-clínicos, iniciar los ensayos clínicos.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado con el extracto total del Chuchuhuasi, podemos obtener las siguientes conclusiones:

- El extracto metanólico de Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*), demostró acción antinociceptiva en modelos simples de dolor visceral.
- La acción antinociceptiva del extracto metanólico de Chuchuhuasi (*Maytenus krukovii*), es bloqueada por la naloxona, lo que nos haría suponer en la participación de receptores opioides en la acción antinociceptiva.

Ph.D., M.D., Benjamín Castañeda C.
Facultad de Medicina Humana
Universidad de San Martín de Porres

AGRADECIMIENTO

A las autoridades y al Instituto de Investigación de la FMH-USMP, por el apoyo, asesoría y financiamiento, de la presente investigación.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Brak Egg A. Tratado de Libre Comercio y Biodiversidad en el Perú. <http://www.caaap.org.pe/down/biodiversidadtlc.pdf>. Junio del 2004.
2. Palacios Lozada E. Economía y plantas medicinales. Facultad de Ciencias Económicas de la UNMSM, Boletín 52, <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/consejo/boletin52/Pdf/a04.pdf>. 2004.
3. Schultes RE, Raffauf RF. The healing forest: medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia. Dioscorides Press, Portland, Or., 1990: página 484.
4. Easterling J. Los Usos tradicionales de rainforest botánico. <http://rain-tree.com/plants.htm>. 1992.
5. Duke J, Vásquez R. Amazonia Ethnobotanical Diccionario. CRC Press, Boca Ratón. 1994.
6. Mejía Kember, Rengifo Salgado, Elsa Liliana. Plantas medicinales de uso popular de la Amazonía Peruana. <http://www.iiap.org.pe/libros.htm>. 1995.
7. Lengua L, Jara P, Liu H, Rubio J, Salazar A. Comparación de la actividad analgésica y antiulcerogénica del *Maytenus krukovii* (Chuchuhuasi), frente a la fármaco terapéutica convencional. Libro de resúmenes del XVII Congreso Científico Internacional de Estudiantes de Medicina Latinoamericanos FELSOCCEM, Universidad Nacional Mayor De San Marcos, LIMA-2002.
8. Rivas E, Lengua L, Liu H, Salazar A, Román L, Salvador I, Rabanal P, Castañeda B, Manrique R, Ibáñez L. Estudio de la actividad analgésica de extractos metanólicos de *Maytenus krukovii* (Chuchuhuasi), *Alchornea castaneifolia* (Hiporuro), *Sambucus nigra* (Saúco), y *Aristeguietia discolor* (Pulmonaria) en ratones frente al ibuprofeno. Revista Horizonte Médico 2005; 5(1): 57-61.
9. Salazar Granara A., et al. Evaluación de la actividad hipotensora del *Maytenus krukovii* (Chuchuhuasi) en rata conciente. Libro de resúmenes del XIX Congreso Científico Nacional de Estudiantes de Medicina de la SOCIPEM, Universidad San Antonio de Abad, Cuzco, Noviembre del 2005.10.

10. Viale S, Thorndike F, Neuman J. Efecto antipirético de la infusión del *Maytenus krukovii* (Chuchuhuasi) en conejos albinos de experimentación, frente a la farmacoterapia convencional. Catalogo de investigación, Instituto de Investigación FMH - USMP. 2003.
11. Oliveira MG, Monteiro MG, Macaubas C, Barbosa VP, Carlini EA. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. J ethnopharmacol. Aug 1991; 34(1):29-41.
12. Gonzalez FG, Portela TY, Stipp EJ, Di Stasi LC. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolemia ilicifolia*. J ethnopharmacol. Sep 2001; 77(1):41-47.
13. Kimura E, Albiero AL, Cuman RK, Caparroz-Assef SM, Oga S, Bersani-Amado CA. Effect of *Maytenus aquifolium* extract on the pharmacokinetic and antiinflammatory effectiveness of piroxicam in rats. Phytomedicine. Apr 2000; 7(2):117-121.
14. Kadriya S, Deeb EL, Rwaida A. Phytochemical and pharmacological studies of *Maytenus forsskaoliana*. Saudi Pharmaceutical Journal. October 2003; 11(4):184-191.
15. Reisine T, Pasternak G. Opioid analgesics and antagonists. In: Hardman JC, Goodman Gilman A, Limbird LE (Eds.). Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. New York, McGraw-Hill. 1996; 521-555.
16. Stein Ch, Yassouridis A. Acción analgésica periférica de la morfina. Rev. Soc. Esp. Dolor 1998; (5):3-7.
17. Antonijevic I, Mousa SA, Schafer M, Stein C. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. J. Neurosci. 1995; (15):165-172.
18. Reichert J. Antinocicepción opiaca periférica y preventiva en un modelo de dolor visceral en ratón. Rev. Soc. Esp. Dolor 2002; (9):423-431.
19. Barber A. Opioid agonist and antagonist: an evaluation of their peripheral actions in inflammation. Med. Res. Rev 1992; (12):525-562.
20. Siegnund E, Cadmus R, Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. Prog Soc Exp Biol Med 1957; (95):729-731.
21. Collier HO, Kinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. Br J Pharmacol 1968; (36):313-320.
22. Thirugnanasambantham P, Viswanathan S, Ramaswamy S, Krishnamurthy V, Mythirayee CI, Ramachandran S, Kameswaran L. Involvement of calcium in flavonoid analgesia. Eur J Pharmacol. Aug 1988;152(3):367-369.
23. Bittar M, De Souza MM, Yunes RA, Lento R, Delle Monache F, Cechinel Filho V. Antinociceptive activity of I3, II8-binarigenin, a biflavonoid present in plants of the guttiferæ. Planta Med 2000; (66):84-86.
26. Ramesh M, Rao YN, Rao AV, Prabhakar MC, Rao CS, Muralidhar N, Reddy BM. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of a flavonoid isolated from *Caralluma attenuata*. J. Ethnopharmacol 1998; (62):63-66.
27. Hossein Hosseinzadeh, Hani M Younesi. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. BMC Pharmacology 2002; (2):7.