



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES**

**DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS
INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA
DE LAS HOJAS DE *ARISTOTELIA CHILENSIS* EN
UN MODELO DE DOLOR TÉRMICO AGUDO**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

MARIELA DEL CARMEN FARÍAS MARENGO

**PROFESORA PATROCINANTE
DRA. CARLA DELPORTE VERGARA**

**DIRECTORES DE MEMORIA
DRA. CARLA DELPORTE VERGARA
DR. HUGO MIRANDA GUZMÁN**

SANTIAGO, CHILE
2009

TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
CAPÍTULO I.	INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II.	ANTECEDENTES DE <i>Aristotelia chilensis</i>	3
	2.1.- Clasificación taxonómica	3
	2.2.- Distribución geográfica	4
	2.3.- Descripción botánica	4
	2.4.- Usos en la medicina popular	4
	2.5.- Estudios previos: químicos y farmacológicos	4
CAPÍTULO III.	HIPÓTESIS	10
CAPÍTULO IV.	OBJETIVOS	11
	4.1.- Objetivos Generales	11
	4.2.- Objetivos Específicos	12
CAPÍTULO V.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
	5.1.- Animales	13
	5.2.- Muestras	13
	5.3.- Fármacos antagonistas	14
	5.3.1.- Antagonistas opioides	14
	5.3.2.- Antagonistas serotoninérgicos	15
	5.3.3.- Antagonistas adrenérgicos	15
	5.3.4.- Antagonistas muscarínicos	15
	5.3.5.- Inhibidor de óxido nítrico sintasa (NOS)	15
	5.4.-Ensayo del latigazo de la cola (Test tail-flick)	16
	5.5.-Procedimiento	17
	5.5.1.- Animales controles salino	17

5.5.2.- Animales controles extractos	17
5.5.3.- Animales pretratados con antagonista + extracto	17
5.6.- Análisis estadístico	19
CAPITULO VI. RESULTADOS	20
6.1.- Efecto antinociceptivo del grupo control salino	20
6.2.- Efecto antinociceptivo del grupo control extracto	20
6.3.- Efecto antinociceptivo de los extractos de <i>A. chilensis</i>	21
previo tratamiento con:	
6.3.1.- Antagonistas opioides	21
6.3.2.- Antagonistas serotoninérgicos	24
6.3.3.- Antagonistas adrenérgicos	26
6.3.4.- Antagonistas muscarínicos	28
6.3.5.- Inhibidor de NOS	30
CAPITULO VII. DISCUSIONES	32
CAPITULO VIII. CONCLUSIONES	37
CAPITULO IX. BIBLIOGRAFIA	39

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
TABLA 1	Algunos constituyentes químicos de las hojas de <i>Aristotelia chilensis</i> (Mol.) Stuntz	6
TABLA 2	Actividad antinociceptiva vía tópica de extractos de <i>A. chilensis</i> : EH, EDCM y EM correspondiente a su CE ₂₅ en el test de tail-flick	20
TABLA 3	Efectos del pretratamiento con antagonistas opioides en la actividad antinociceptiva de los extractos de <i>A. chilensis</i> en el test tail-flick	22
TABLA 4	Efectos del pretratamiento con tropisetron (TROPI), bloqueador serotoninérgico, en la actividad antinociceptiva de los extractos de <i>A. chilensis</i> en el test tail-flick	24
TABLA 5	Efectos del pretratamiento con prazosin (PRA) y yohimbina (YOH) en la actividad antinociceptiva de los extractos de <i>A. chilensis</i> en el test tail-flick	26
TABLA 6	Efectos del pretratamiento con atropina (ATRO) en la actividad antinociceptiva de los extractos de <i>A. chilensis</i> en el test tail-flick:	28
TABLA 7	Efectos del pretratamiento con L-NAME (5 mg/Kg) en la actividad antinociceptiva de los extractos de <i>A. chilensis</i> en el test tail-flick	30

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

		Página
FIGURA 1	Árbol, hojas y frutos de <i>Aristolelia chilensis</i> (Mol) Stuntz.	3
FIGURA 2a	Alcaloides presentes en las hojas de <i>Aristolelia chilensis</i> (Mol.) Stuntz	7
FIGURA 2b	Alcaloides presentes en las hojas de <i>Aristolelia chilensis</i> (Mol.) Stuntz	8
FIGURA 3	Antocianinas identificadas en los frutos de <i>A. chilensis</i> (Mol.) Stuntz por Escribano-Bailón et al.	9
FIGURA 4	Procedimiento del ensayo de tail-flick	18
FIGURA 5	Histograma del efecto antinociceptivo producido por los extracto EH, EDCM y EM de <i>A. chilensis</i> vía tópica, previa administración i.p. de NTX (1 mg/Kg) antagonista opioide en el test tail-flick	22
FIGURA 6	Histograma del efecto antinociceptivo producido por los extracto EH, EDCM y EM de <i>A. chilensis</i> vía tópica, previa administración i.p de NTI (1 mg/Kg) antagonista opioide en el test tail-flick	23
FIGURA 7	Histograma del efecto antinociceptivo producido por los extracto EH, EDCM y EM de <i>A. chilensis</i> vía tópica, previa administración i.p de Nor-BNI (5 mg/Kg) antagonista opioide en el test tail-flick	23

FIGURA 8	Histograma de efecto antinociceptivo producido por los extractos EH, EDCM y EM de <i>A. chilensis</i> vía tópica, previa administración i.p. de TRO (1mg/Kg) bloqueador serotoninérgico en el test tail-flick.	25
FIGURA 9	Histograma de efecto antinociceptivo producido por los extractos EH, EDCM y EM de <i>A. chilensis</i> vía tópica, previa administración i.p. de PRA (0,1 mg/Kg) antagonista adrenérgico α -1 en el test tail-flick.	27
FIGURA 10	Histograma de efecto analgésico producido por los extractos EH, EDCM y EM de <i>A. chilensis</i> vía tópica, previa administración i.p. de YOH (0,01 mg/Kg) antagonista adrenérgico α -2 en el test tail-flick.	27
FIGURA 11	Histograma de efecto analgésico producido por los extractos EH, EDCM y EM de <i>A. chilensis</i> vía tópica, previa administración i.p. de ATRO (1 mg/Kg) en el test tail-flick.	29
FIGURA 12	Histograma de efecto analgésico producido por los extractos EM, EDCM y (EH) de <i>A. chilensis</i> vía tópica, previa administración i.p. de L-NAME (5 mg/Kg) en el test tail-flick	31

ABREVIATURAS

AINES = antiinflamatorios no esteroideos

ATRO= atropina

CE₂₅ = concentración que produce un 25% de efecto

cGMP = guanilato ciclasa

DMSO= dimetilsulfóxido

DOP-R= receptor opioide delta

EDCM= extracto de diclorometano

EH = extracto de hexano

EM= extracto de metanol

i.p.= intraperitoneal

I.R.= infrarrojo

KOP-R= receptor opioide kappa

L-NAME= N^G-nitro- L-Arginina Metil Ester

L-NMMA= N^G-Monometil-L-Arginina

MOP-R= receptor opioide mu

M.P.E.= Efecto máximo posible

NDMA= N-metil-D-aspartato

NO= óxido nítrico

Nor-BNI= Nor-binaltorfimina

NOS= óxido nítrico sintasa

NTI= naltrindol

NTX= naltrexona

PRA= prazosin

SEM= error estándar de la media

SNC= sistema nervioso central

TRO= tropisetron

YOH= yohimbina

RESUMEN

DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DE LAS HOJAS DE *ARISTOTELIA CHILENSIS* EN UN MODELO DE DOLOR TÉRMICO AGUDO

Aristolelia chilensis (Mol) Stutz, también conocida como maqui, es una especie perteneciente a la familia Eleaocarpaceae, un árbol nativo de Chile y Argentina. La medicina popular le atribuye a las hojas de esta especie, propiedades analgésicas y antiinflamatorias siendo respaldadas por estudios científicos y se ha determinado además que las hojas poseen actividades antimicrobiana y antioxidante. Sus frutos son explotados como alimento y fuente de colorantes.

El presente estudio examinó los posibles mecanismos involucrados en el efecto antinociceptivo tópico de tres extractos de hexano (EH, 3,5%p/v), diclorometano (EDCM, 4,5%p/v) y metanol (EM, 2,7%p/v) obtenidos desde las hojas de *Aristolelia chilensis*, a una concentración correspondiente a su CE₂₅, utilizando como modelo experimental un ensayo de dolor térmico agudo como es el *tail flick* en ratones y la administración previa vía intraperitoneal (i.p.) de los siguientes antagonistas: naltrexona (NTX), naltrindol(NTI), nor-binaltorfimina (Nor-BNI), tropisetron (TRO), prazosin(PRA), yohimbina (YOH), atropina (ATRO) y N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

La antinocicepción causada por EDCM y EM fue modificada por NTX, antagonista de MOP-R, mientras que NTI, antagonista de DOP-R sólo varió la analgesia de EM. En contraste, Nor-BNI no provocó cambios significativos en la antinocicepción de los extractos en estudio. El antagonista serotoninérgico (TRO) incrementó el efecto analgésico de EH y EDCM, sin embargo no modificó

significativamente la actividad analgésica de EM. Por otro lado, el antagonista adrenérgico (α -1) PRA aumentó el efecto analgésico de EH, EDCM y EM, mientras que YOH, antagonista adrenérgico (α -2) causó una modificación significativa de la antinocicepción de los extractos EDCM y EM, no así de la analgesia de EH. Por otra parte, la administración de ATRO, antagonista colinérgico muscarínico aumentó la analgesia de EH y EM, no así de EDCM. Por último, L-NAME incrementó significativamente los efectos analgésicos de los extractos EH, EDCM y EM.

En conclusión, la actividad analgésica de EH estaría modulada por receptores serotoninérgicos (5-HT_3), adrenérgicos (α -1), colinérgico muscarínico (ACh-M) y vía L-arginina/NO. En cambio la actividad antinociceptiva de EDCM es modulada por las vías opioide, serotoninérgicas, adrenérgicas y nitridérgicas. Mientras que en el efecto analgésico de EM estarían involucrados los sistemas opioide, adrenérgico, colinérgico muscarínico y L-arginina/NO.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE MECHANISMS INVOLVED IN THE ANALGESIC ACTIVITY OF *ARISTOTELIA CHILENSIS* LEAVES IN AN ACUTE THERMAL PAIN MODEL

Aristotelia chilensis (Mol) Stutz, known as “maqui” is a native tree from Chile and Argentina belonging to Eleocarpaceae family specie. Popular medicine ascribes analgesic and anti-inflammatory properties to the leaves of this specie. These facts have been supported by scientific studies and also determining that the leaves have antimicrobial and antioxidant properties. The fruits are exploited as food and dye source.

The present study searches for possible mechanisms involved in the antinociceptive topic effect of the three extracts: hexane (EH, 3,5% w/w), dichloromethane (EDCM, 4,5% w/w) and methanol (EM, 2,7% w/w) obtained from the leaves of *A. chilensis*, with a concentration corresponding to its EC₂₅ using as a experimental model an acute thermal pain assay as is the so called tail flick in mices and the intraperitoneal (i.p.) administration of the following antagonist: naltrexone (NTX), naltrindole (NTI), nor-binaltorfimine (Nor-BNI), tropisetron (TRO), prazosin(PRA), yohimbine (YOH), atropine (ATRO) y N-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME).

The antinociception caused by the EDCM and EM extracts was modified by NTX an MOP-R antagonist, while the DOP-R antagonist, NTI only modified the EM analgesia. In the opposite, Nor-BNI does not bring significative changes in the antinociception of the extracts under study. The serotonergic antagonist (TRO) increased the analgesic effect of the EH and EDCM, nevertheless it did not modify significantly the analgesic activity of EM. In another aspect, the adrenergic antagonist (α -1) PRA increased the analgesic effect of EH, EDCM and EM, while YOH adrenergic antagonist (α -2) produced a significative modification of the antinociception of both EDCM and EM extracts, but did not

affect the analgesic effect of the EH was observed. In the other hand, the administration muscarinic cholinergic antagonist ATRO, increased the analgesic effect of EH and EM, but not of EDCM. Finally, L-NAME significantly increased the analgesic effects of the EH, EDCM and EM extracts.

As a final result, the analgesic activity the EH would be modulated by serotonergic (5-HT₃), adrenergic (α -1), muscarinic cholinergic (Ach-M) receptors and L-arginine/NO pathway. The antinociceptive activity of EDCM is modulated by opioid, serotonergic, adrenergic and nitridergic pathways. In the analgesic effect of EM would be involved the opioid, adrenergic, muscarinic cholinergic and L-arginine/NO systems.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Desde el reino vegetal, el hombre primitivo obtuvo los medios para su alimentación, abrigo, salud y bienestar en general. Así los primeros medicamentos tuvieron su origen en las plantas, muchas de las cuales por sus propiedades curativas están actualmente en uso, destacando aquellas que poseen propiedades analgésicas debido a que el dolor es una sensación desagradable, molesta y muchas veces invalidante, sin embargo es un mecanismo de defensa y/o de protección fundamental para evitar que se dañe más el tejido u órgano afectado. (MORÓN et al, 2002)

Un ejemplo de lo anterior es el árbol de *Aristolelia chilensis* (Mol.) Stuntz, de la familia Elaeocarpaceae, conocida popularmente como “maqui”, especie nativa de Chile y Argentina, y a cuyas hojas la medicina folclórica le ha atribuido propiedades principalmente analgésicas y antiinflamatorias, utilizándolas para aliviar malestares bucofaríngeos. Entre los estudios químicos realizados a las hojas de esta especie se ha identificado la presencia de los siguientes metabolitos: alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenos, entre otros, mientras que sus frutos que son comestibles contienen altos niveles de polifenoles proporcionando un efecto cardioprotector (ESCRIBANO-BAILÓN et al, 2006; MIRANDA-ROTTMANN et al, 2002).

Un estudio realizado a *A. chilensis* en el Laboratorio de Productos Naturales del departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias de Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile respaldó científicamente las propiedades farmacológicas antiinflamatorias y analgésicas de sus hojas asignadas por la medicina popular, determinando además que las

hojas poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes (TORRES, 2007).

Para comprender el mecanismo de acción de la analgesia producida por el maqui, es que se desarrolló el presente estudio para determinar los sistemas de receptores que participan en la actividad antinociceptiva de *A. chilensis*, utilizando diferentes antagonistas de receptores que están presentes en el sistema nervioso e involucrados en la percepción y mecanismo del dolor.

La actividad antinociceptiva se evaluará con un modelo de inducción del dolor térmico agudo como es el *tail flick* (latigazo de la cola), este ensayo es muy usado en estudios preclínicos de nocicepción para evaluar las drogas que actúan a nivel central, consiste en un estímulo termal focalizado en la piel de la cola del ratón activando los nociceptores de las capas superficiales de la piel, gatillando una serie de procesos a nivel espinal. La respuesta del tail-flick sería modulada desde sitios supraespinales (LE- BARS et al, 2001; DOGRUL et al, 2007).

A lo largo de los últimos años se han logrado avances significativos en la comprensión de la organización molecular, celular y anatómica del sistema nociceptivo y los mecanismos centrales de control del dolor. Estos mecanismos han sido largamente estudiados en modelos experimentales de dolor, los cuales pueden o no reproducir las condiciones del dolor humano, proveen una visión de los complejos mecanismos fisiopatológicos del dolor y los blancos potenciales para el tratamiento (BENARROCH, 2005).

CAPITULO II ANTECEDENTES

2.1.- Clasificación taxonómica:

FAMILIA : Elaeocarpaceae

GÉNERO : *Aristotelia*

ESPECIE : *Aristotelia chilensis*

NOMBRE VULGAR : maqui, koelon, maquie, queldron, clon.

SINÓNIMO: *Cornus chilensis* Mol.; *Aristotelia macqui* L'Hér.; *A. macqui* L'Hér. var. *andina* Phil.; *A. macqui* L'Hér. var. *alpestris* Reiche; *A. macqui* L'Hér. var. *leucocarpa* Dimitri; *A. glandulosa* Ruiz & Pav.



Fig. 1: Árbol, hojas y frutos de *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (HOFFMAN, 1997).

2.2.- Distribución geográfica:

Aristotelia chilensis (Mol) Stuntz, es una especie que se distribuye en Chile desde el valle del Limarí (IV región) hasta Aysén (XI región), encontrándose también en el sur-oeste de Argentina (RODRÍGUEZ, 2004).

2.3.- Descripción botánica:

Es un árbol de hasta 5 m de altura, de ramas delgadas y flexibles, corteza lisa y blanda. Los frutos maduros son bayas redondeadas, negras, brillantes de 4 a 5 mm de diámetro. Sus hojas son perennes, simples, opuestas, oval-lanceolada, borde aserrado. Sus flores son blancas y pequeñas (MUÑOZ et al, 2001).

2.4.- Usos en la medicina popular:

Es una especie muy utilizada por el pueblo mapuche (MOLARES et al, 2009) y campesino, la infusión de sus hojas es usada para aliviar enfermedades de la garganta, mientras que las hojas pulverizadas son útiles para curar heridas. Por otra parte, a sus frutos se le atribuyen propiedades antidiarreicas, antihemorroidales, también facilitaría el trabajo de parto y es utilizado para darle tinte al vino (MUÑOZ, 1992).

2.5.- Estudios previos: Químicos y Farmacológicos.

Hojas:

Estudios químicos efectuados a las hojas de *A. chilensis* han demostrado que es una especie rica en alcaloides indólicos (Tabla 1, Fig. 2a y 2b), pero

no se han podido aislar en cantidades suficientes para evaluar actividades biológicas, sólo se le ha podido atribuir actividad farmacológica a aristotelina, observándose que disminuye el flujo sanguíneo y pulso en ratas (HEYWOOD et al, 1978), también se ha podido determinar la presencia de esteroides (β -sitosterol), flavonoides (quercetina) (TORRES Y COMIN, 1975), glicósidos de cianidina, delfinidina, malvidina, petunidina, cumarinas (escopoletina) y triperenos varios (SILVA et al, 1995).

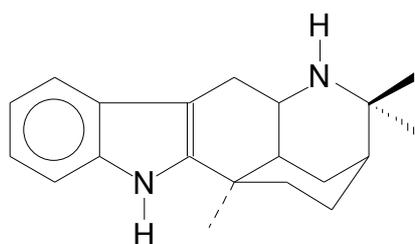
También se logró aislar en la especie un alcaloide quinolónico denominado aristoquinolina (Fig.2b)(ARMANDO, 1996) y un alcaloide isoquinolónico, denominado protopina (Fig.2b) (MUÑOZ et al, 2007).

Un estudio reciente señala que las infusiones de hojas de *A chilensis* podrían ser una buena fuente de antioxidante debido a su composición fenólica, constituyendo un apoyo para la prevención de enfermedades cuya etiología radique en el estrés oxidativo (AVELLO et al, 2008). Sin embargo, otro estudio in vitro señala que la presencia de flavonoides en un extracto acuoso de las hojas de *A. chilensis* induciría una alteración en la morfología de eritrocitos humanos (SUWALSKY et al, 2008).

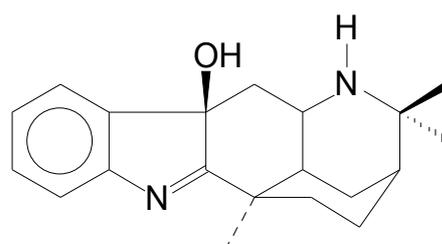
Tabla 1: Algunos constituyentes químicos de las hojas de *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz

COMPUESTO	EJEMPLO	AUTOR(ES)
Alcaloide indólico	Aristotelina	GOPALAKRISHNA et al, 1978
Alcaloide indólico	Aristotelinina	
Alcaloide indólico	Aristotelona	BHAKUNI et al, 1976
Alcaloide indólico	Aristona	BITTNER et al, 1978
Alcaloide indólico	8-oxo-9- dehidrohorbatina	CÉSPEDES et al,1990
Alcaloide indólico	Makonina	
Alcaloide indólico	Aristolenona	
Alcaloide indólico	8-oxo-9- dehidromakomakina	WATSON et al, 1989
Alcaloide indólico	Serratolina	MUÑOZ, 1992
Alcaloide indólico	Hobartina	
Alcaloide indólico	Aristotelinona	
Alcaloide quinolónico	Aristoquinolina	ARMANDO, 1996
Alcaloide isoquinolífico	Protopina	MUÑOZ et al., 2007
Flavonoide	Quercetina	TORRES Y COMIN,
Esteroles	β -sitosterol	1975

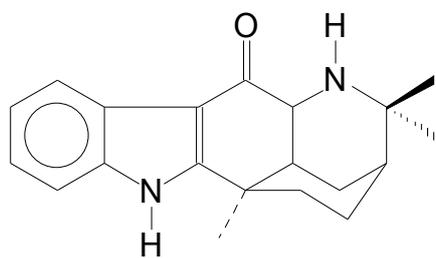
Fig. 2a: Alcaloides presentes en las hojas de *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz



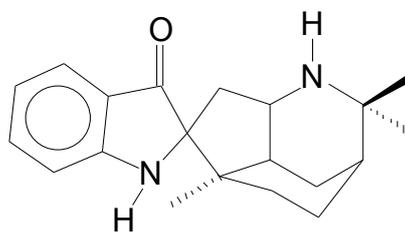
Aristotelina



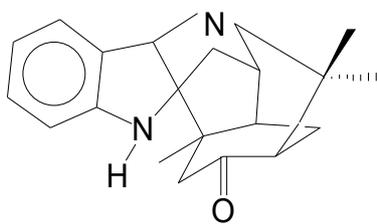
Aristotelinina



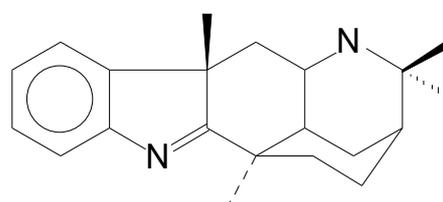
Aristotelinona



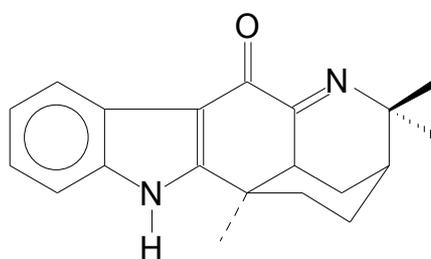
Aristotelona



Aristona

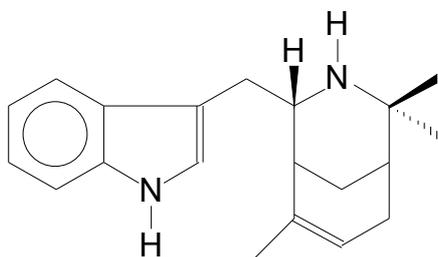


Serratolina

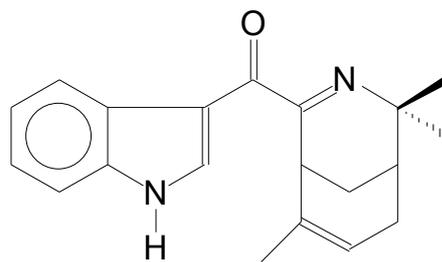


Makonina

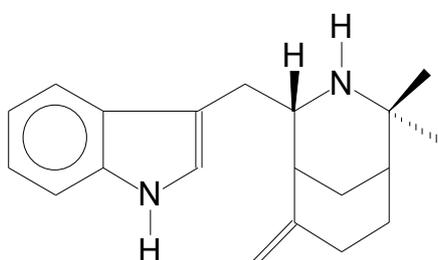
Fig. 2b: Alcaloides presentes en las hojas de *Aristolelia chilensis* (Mol.) Stuntz



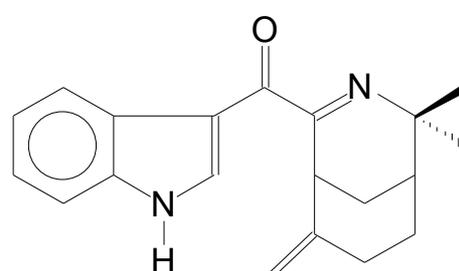
Hobartina



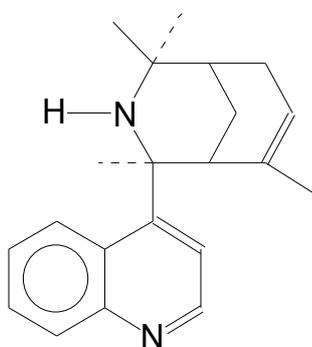
8-oxo-9-dehidrohobartina



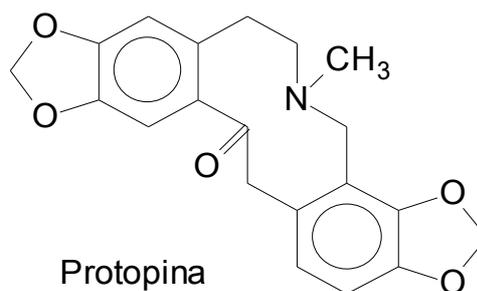
Makomakina



8-oxo-9-dehidromakomakina



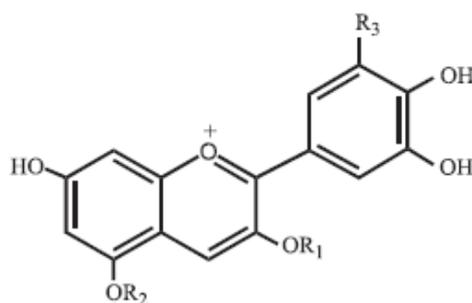
Aristoquinolina



Protopina

Frutos:

Por otra parte, debido a los altos niveles de polifenoles que se han detectado en los frutos de *A. chilensis*, entre los que destacan las antocianinas identificadas por Escribano-Bailón et al (2006), compuestos responsables de la pigmentación purpúrea de éstos, se ha comprobado que los frutos presentan actividades como antioxidante, antiaterogénico y cardioprotector (MIRANDA-ROTTMANN et al, 2002; CÉSPEDES et al, 2008).



R1	R2	R3	Proposed identity
Xyl-Glc	Glc	OH	Delphinidin 3-sambubioside-5-glucoside
Glc	Glc	OH	Delphinidin 3,5-diglucoside
Xyl-Glc	Glc	H	Cyanidin 3-sambubioside-5-glucoside
Glc	Glc	H	Cyanidin 3,5-diglucoside
Xyl-Glc	H	OH	Delphinidin 3-sambubioside
Glc	H	OH	Delphinidin 3-glucoside
Xyl-Glc	H	H	Cyanidin 3-sambubioside
Glc	H	H	Cyanidin 3-glucoside

Fig.3: Antocianinas identificadas en los frutos de *A. chilensis* (Mol.) Stuntz por Escribano-Bailón et al, 2006.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

En la actividad analgésica de los diferentes extractos de *Aristolelia chilensis* (Mol.) Stuntz participan mecanismos centrales y periféricos.

La hipótesis está basada en las propiedades analgésicas *in vivo* demostradas previamente en distintos modelos farmacológicos en un estudio realizado en el Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (TORRES, 2007).

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GENERALES

Determinar los mecanismos de acción de la actividad analgésica tópica de diferentes extractos obtenidos desde las hojas de *A. chilensis*, mediante la administración intraperitoneal (i.p.) de diversos antagonistas y la utilización de un ensayo experimental de dolor térmico agudo.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar *in vivo* la actividad analgésica tópica de los diferentes extractos de maqui.
- Comparar la actividad antinociceptiva tópica entre los extractos de maqui: EH, EDCM y EM a una concentración correspondiente a su CE₂₅ en presencia de diferentes antagonistas.
- Evaluar la interacción farmacológica entre los diferentes extractos de maqui y los fármacos antagonistas.
- Evaluar la intervención del sistema opioide en el efecto analgésico de los diferentes extractos de maqui.
- Evaluar la intervención del sistema adrenérgico en el efecto analgésico de los diferentes extractos de maqui.

- Evaluar la intervención del sistema serotoninérgico en el efecto analgésico de los diferentes extractos de maqui.
- Evaluar la intervención del sistema colinérgico en el efecto analgésico de los diferentes extractos de maqui.
- Evaluar la intervención del sistema nitridérgico en el efecto analgésico de los diferentes extractos de maqui.
- Atribuir a algún metabolito secundario las propiedades analgésicas presentadas por los extractos.

CAPITULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- ANIMALES:

Se utilizaron ratones de la cepa CF-1 (*Mus musculus*) de ambos sexos, con un peso de 28 ± 2 g, aclimatados al ambiente del laboratorio 2 horas previas al ensayo. El ensayo se realizó de acuerdo al protocolo previamente aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El número de animales fue el mínimo necesario para obtener significancia estadística, en este caso se utilizaron 27 grupos (n=6), cada animal fue usado sólo una vez y recibió sólo una dosis de cada extracto en estudio y de las drogas antagonistas, las observaciones fueron efectuadas en forma randomizada y ciega. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical luego del periodo de observación.

5.2.- MUESTRAS:

Las muestras en estudio fueron obtenidas desde el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, y consistieron en tres extractos de hojas de maqui: hexánico (EH, 3,5%), diclorometano (EDCM, 4,5%) y metanólico (EM, 2,7%), disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) con una concentración correspondiente a su CE_{25} , que se calculó previamente mediante un análisis de regresión lineal de las correspondientes curvas dosis-respuesta de los extractos determinados en un estudio previamente (TORRES, 2007). Estos extractos de maqui fueron administrados por vía tópica.

5.3.- FÁRMACOS ANTAGONISTAS:

Los fármacos antagonistas utilizados en el estudio fueron suministrados por el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Estos fármacos fueron disueltos en solución salina, administrados en volumen constante de 10 mg/mL vía i.p. y al tiempo correspondiente a su efecto máximo, 30 minutos antes de exponer los animales a la administración vía tópica de cada extracto, con excepción del Nor-BNI que fue de 60 min. También es importante señalar que los fármacos a esas concentraciones no presentan un efecto analgésico significativo (MIRANDA et al, 2008)

5.3.1.- Antagonistas opiodes:

- Naltrexona (NTX) (1mg/Kg), antagonista no selectivo, pero con mayor afinidad a los receptores MOP-R¹ de mayor potencia y duración de efecto entre los opiodes.

- Naltrindol (NTI) (1 mg/Kg) antagonista selectivo de receptores DOP-R.

- Nor-binaltorfimina (Nor-BNI)(0,5 mg/Kg) antagonista selectivo de receptores KOP-R.

¹ De acuerdo a International Union Pharmacology, la nomenclatura para los receptores opiodes será referida como receptores MOP, DOP, KOP (MOP-R, DOP-R, KOP-R) para los receptores mu (μ), delta (δ) y kappa (κ), respectivamente. (WALDHOER et al, 2004).

5.3.2.- Antagonistas serotoninérgicos:

- Tropisetron (TRO) (1mg/Kg): inhibidor de receptores de serotonina 5-HT₃

5.3.3.- Antagonistas adrenérgicos:

- Prazosin (PRA) (0,1 mg/Kg): antagonista de receptores adrenergicos α_{1A}
- Yohimbina (YOH) (0,01 mg/Kg): antagonista de receptores adrenergicos α_2

5.3.4.- Antagonista muscarínicos:

- Atropina (ATRO)(1 mg/Kg): antagonista de receptores muscarínicos colinérgicos

5.3.5.- Inhibidor de óxido nítrico sintasa (NOS):

- N^G-nitro- L-Arginina Metil Ester (L-NAME) (5 mg/Kg): inhibidor no selectivo de NOS

5.4.- ENSAYO DEL LATIGAZO DE LA COLA (TEST TAIL-FLICK):

La evaluación antinociceptiva se realizó utilizando el método algesiométrico del tail-flick. Este ensayo se basa en la inducción de un dolor agudo térmico mediante la aplicación de radiaciones infrarrojas (I.R.) que se aplica en la cola del ratón en su tercio proximal. Se fijó un tiempo máximo de reacción (cut-off) de 8 s. para evitar daño sobre la piel. Este ensayo se realizó mediante el uso de un algesiómetro (Ugo Basile, Italia) equipo que digitalmente mide el tiempo en que el animal es capaz de soportar el calor (tiempo de latencia), lo que es proporcional al efecto analgésico de la muestra.

La actividad antinociceptiva (% de antinocicepción) se expresa como la diferencia en el tiempo de latencia (media \pm S.E.M.), entre la media de las dos lecturas de controles y de Δ Latencia experimental, datos con los cuales se calculó el M.P.E.% (Maximun Posible Efect) mediante la siguiente formula:

$$\text{MPE\%} = \frac{100 * (\text{Lat 2} - \text{Lat 1})}{(t \text{ cut-off} - \text{Lat 1})}$$

Donde:

Lat 1: tiempo de latencia previo a la administración del extracto.

Lat 2: tiempo de latencia posterior a la administración del extracto.

t cut –off: tiempo máximo de exposición de la cola, el cual es de 8 s.

5.5.- PROCEDIMIENTO:**5.5.1.- Animales controles salino:**

Sólo inyectando suero fisiológico vía i.p., (ver Fig. 4) y luego esperando 30 minutos se procedió a sumergir la cola del animal en suero fisiológico por un tiempo de 3 minutos y posteriormente se esperó 5 minutos antes de realizar la algesiometría.

5.5.2.- Animales controles extractos:

Los extractos de maqui se aplicaron vía tópica durante 3 minutos y posteriormente se esperó 5 minutos antes de realizar la algesiometría.

5.5.3.- Animales pre- tratados con antagonistas + extractos:

A cada animal se le administró vía i.p. un fármaco antagonista (ver Fig. 4), luego se espero el tiempo correspondiente a su efecto máximo, y luego se procedió a sumergir la cola del animal en la solución del extracto correspondiente por un tiempo de 3 minutos y posteriormente a los 5 minutos se realizó la algesiometría.

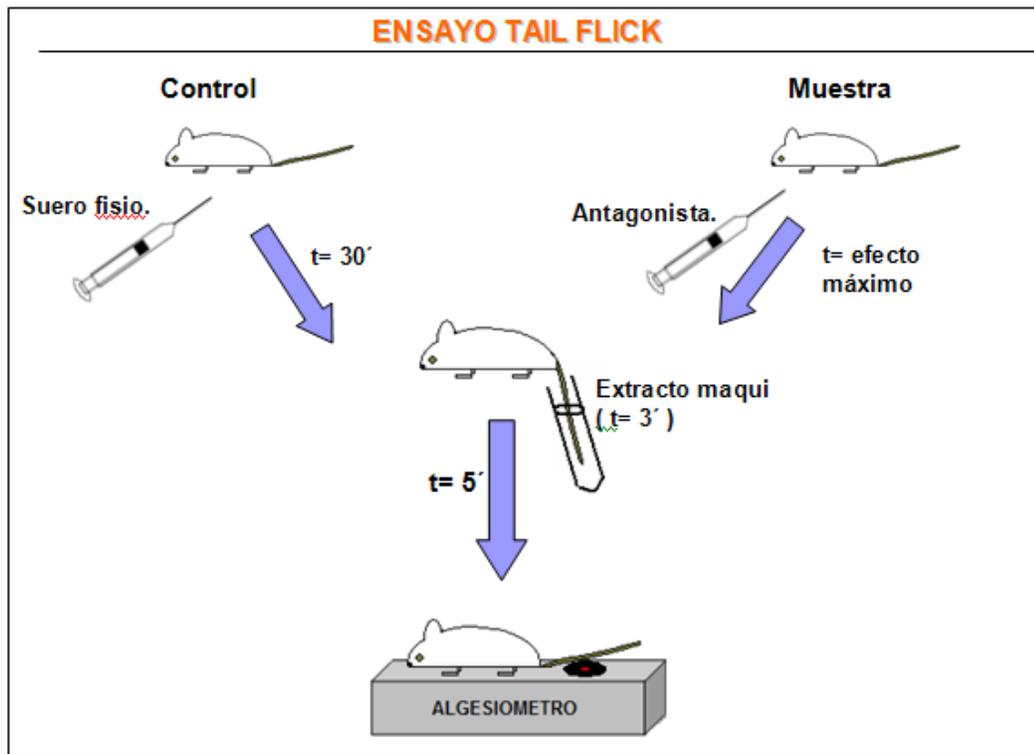


Fig. 4 Procedimiento del ensayo de tail flick

5.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados se presentan como promedios \pm S.E.M.. y fueron analizados estadísticamente mediante el test de student para datos no apareados. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

CAPITULO VI RESULTADOS

6.1.- EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL GRUPO CONTROL SALINO:

Al tratar el grupo control sólo con suero fisiológico 0,9% (10 mL/Kg) vía i.p., se obtuvo un MPE% de $1,69 \pm 1,54$ en el ensayo de tail flick, lo que demuestra que no hay efecto antinociceptivo significativo.

6.2.- EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL GRUPO TRATADO CON EXTRACTOS:

La administración de cada extracto de *A. chilensis*, por vía tópica, con una concentración correspondiente a su CE₂₅, produjo una antinocicepción que se muestra en la tabla 2:

Tabla 2 Actividad antinociceptiva vía tópica de extractos de *A. chilensis*: EH, EDCM y EM correspondiente a su CE₂₅ en el test de tail-flick

EXTRACTO	CE ₂₅ (%p/v, DMSO)	%ANTINOCICEPCION
EH	3,5	30,62 ± 2,36
EDCM	4,5	25,37 ± 1,30
EM	2,7	20,96 ± 2.98

También cabe señalar que administración de los extractos por vía tópica no indujeron cambio visible en el comportamiento o actividad motora de los animales.

Por otra parte, al relacionar las concentraciones CE_{25} (%p/v) de los extractos, se puede obtener las potencias relativas de los extractos, obteniéndose que EM es 1,66 veces más potente que EDCM y EH es 0,77 veces más potente que EDCM.

6.3 .- EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LOS EXTRACTOS DE *A. CHILENSIS* PREVIO TRATAMIENTO CON ANTAGONISTAS:

6.3.1.- Antagonistas Opioides:

El efecto del pretratamiento con NTX (1mg/Kg), NTI (1 mg/Kg) y Nor-BNI(0,5 mg/Kg) por vía i.p., en la actividad antinociceptiva presentada por los extractos EH, EDCM y EM de *A. chilensis* se resumen en la Tabla 3:

NTX, antagonista no selectivo de receptores MOP, provocó una variación significativa en el efecto analgésico de los extractos EDCM y EM, como se muestra en la Fig. 5 en el ensayo algésimétrico termal.

NTI, antagonista selectivo de receptores DOP, sólo modificó el efecto analgésico de EM, no así en los extractos EDCM y EH, como se indica en la Fig. 6.

NorBNI, antagonista selectivo de receptores KOP, no causó modificaciones significativas en el efecto antinociceptivo de los extractos en estudio como se observa en la Fig. 7

Tabla 3 Efectos del pretratamiento con antagonistas opioides en la actividad antinociceptiva de los extractos de *A. chilensis* en el test tail-flick

	EH	EDCM	EM
	% MPE	% MPE	% MPE
Extracto (CE ₂₅) _t .	30,62 ± 2,36	25,37 ± 1,30	20,96 ± 2,98
NTX _{i.p.} + Extracto	28,15 ± 2,38	34,07 ± 1,58 *	31,74 ± 3,63 *
NTI _{i.p.} + Extracto	30,46 ± 1,27	30,53 ± 2,34	32,49 ± 2,43 *
NOR-BNI _{i.p.} + Extracto	31,38 ± 4,41	31,36 ± 3,43	26,89 ± 4,38

*p<0,05

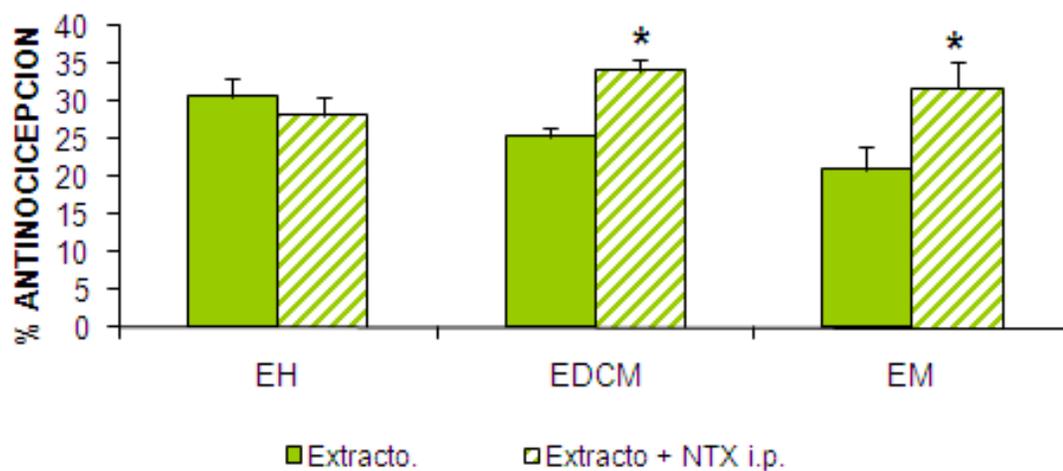


Fig 5. Histograma del efecto antinociceptivo producido por los extractos EH, EDCM y EM de *A. chilensis* vía tópica previa administración i.p. de NTX (1 mg/Kg) antagonista opioide en el test tail-flick. * p<0,05

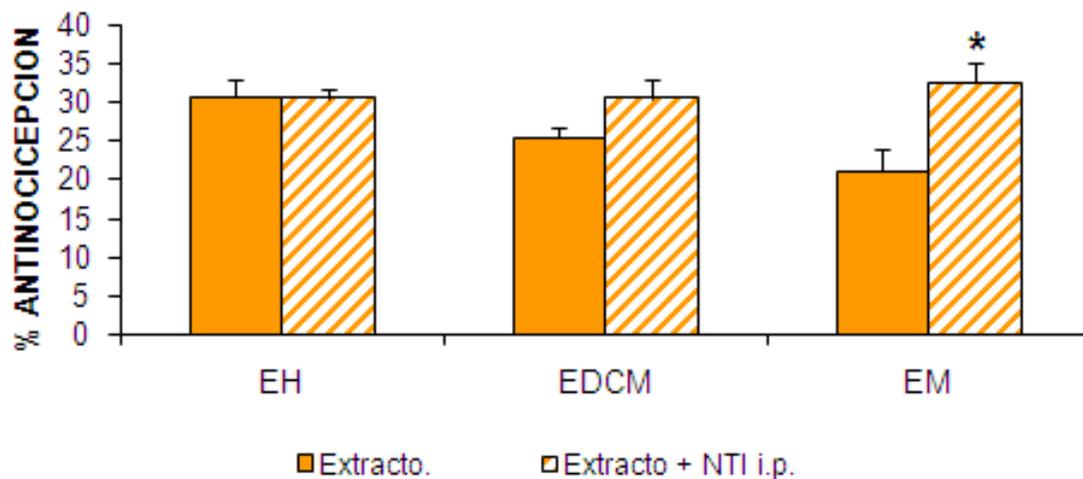


Fig 6. Histograma del efecto antinociceptivo producido por los extractos EH, EDCM y EM de *A. chilensis* vía tópica previa administración i.p de NTI (1 mg/Kg) antagonista opioide en el test tail-flick. * $p < 0,05$

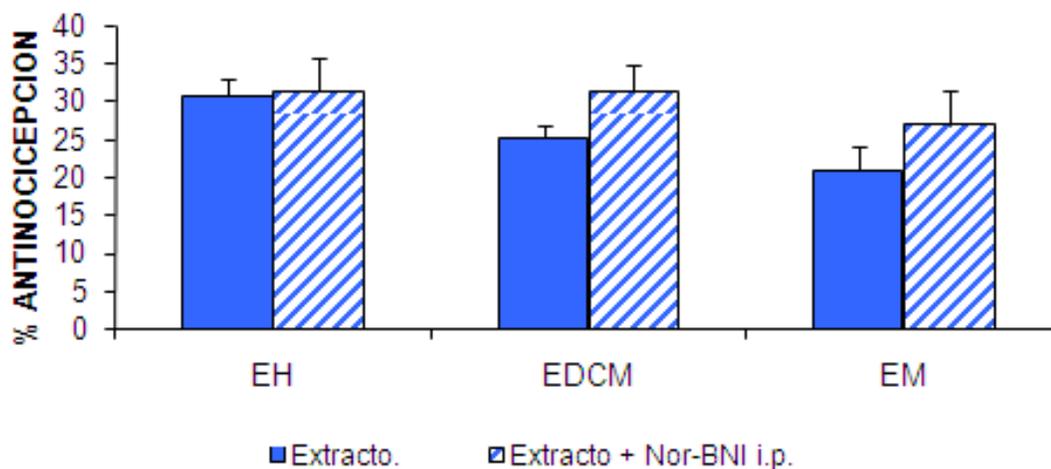


Fig 7. Histograma del efecto antinociceptivo producido por los extracto EH, EDCM y EM de *A. chilensis* vía tópica previa administración i.p de Nor-BNI (5 mg/Kg) antagonista opioide en el test tail-flick. * $p < 0,05$

6.3.2.- Antagonista serotoninérgico:

El pretratamiento de tropisetron (TRO) (1mg/Kg), bloqueador selectivo del subtipo de receptor 5-HT₃, indujo un incremento significativo en la actividad antinociceptiva de EH y EDCM. Sin embargo, no provocó cambio significativo en la actividad analgésica de EM. Estos resultados se muestran en la tabla 4 y fig. 8

Tabla 4 Efectos del pretratamiento con tropisetron (TROPI), bloqueador serotoninérgico, en la actividad antinociceptiva de los extractos de *A. chilensis* en el test tail-flick

	EH	EDCM	EM
	% MPE	% MPE	% MPE
Extracto (CE ₂₅) t.	30,62 ± 2,36	25,37 ± 1,30	20,96 ± 2,98
TROPI _{i.p.} + Extracto	44,07 ± 4,82*	38,43 ± 2,17*	30,37 ± 4,39

*p<0,05

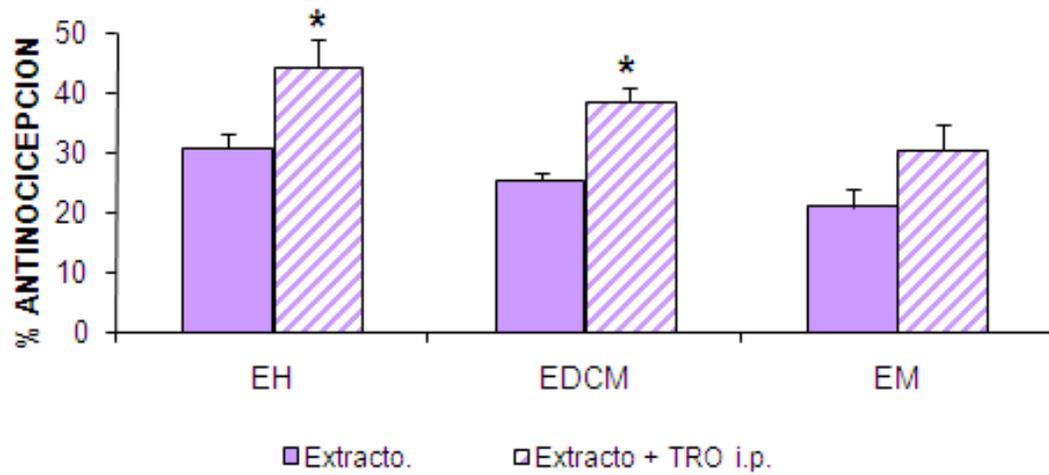


Fig 8. Histograma de efecto antinociceptivo producido por los extractos EH, EDCM y EM de *A. chilensis* vía tópica, previa administración i.p. de TRO(1mg/Kg) bloqueador serotoninérgico en el test tail-flick. *p < 0,05

6.3.3.- Antagonistas adrenérgicos:

Al tratar a los animales previamente con PRA (0,1 mg/Kg), i.p. antagonista selectivo α_1 -adrenoceptor, se obtuvo que los tres extractos EH, EDCM y EM de *A. chilensis* aumentaron significativamente su efecto analgésico, como se observa en la tabla 5 y fig.9, siendo el EM que mostró el mayor incremento en su actividad analgésica ($51,95 \pm 2,87$) con respecto a su control ($25,08 \pm 4,82$).

Por otra parte, el pretratamiento con YOH (0,01 mg/Kg), i.p. antagonista selectivo α_2 -adrenoceptor, sólo modificó significativamente la actividad antinociceptiva de los extractos EDCM y EM, como se indica en la tabla 5 y fig. 10

Tabla 5 Efectos del pretratamiento con prazosin (PRA) y yohimbina (YOH) en la actividad antinociceptiva de los extractos de *A. chilensis* en el test tail-flick

	EH	EDCM	EM
	% MPE	% MPE	% MPE
Extracto (CE ₂₅) t.	30,62 ± 2,36	25,37 ± 1,30	20,96 ± 2,98
PRA i.p. + Extracto	38,30 ± 2,67*	39,34 ± 6,76*	51,95 ± 2,87*
YOH i.p. + Extracto	35,46 ± 2,56	35,91 ± 2,90*	32,4 ± 1,91*

*p<0,05

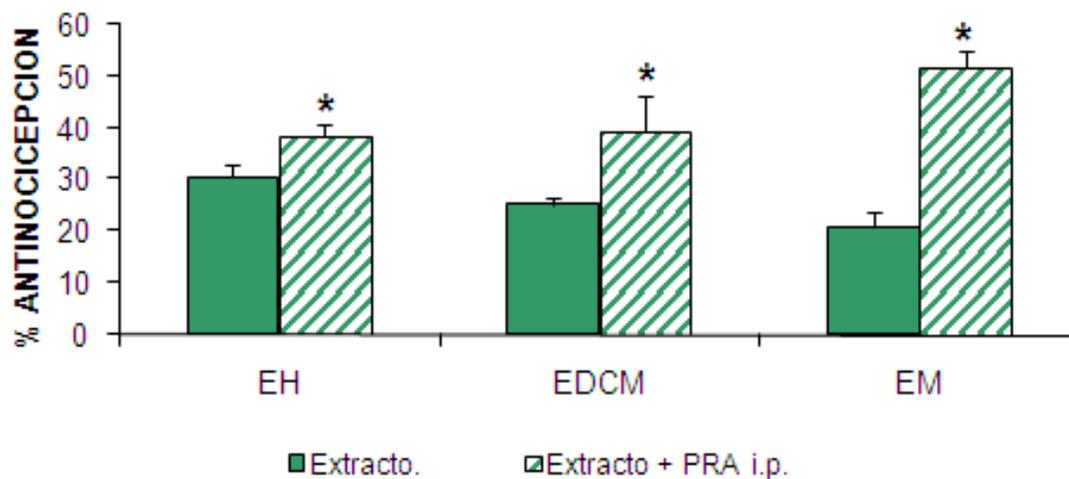


Fig 9. Histograma de efecto antinociceptivo producido por los extractos EH, EDCM y EM de *A. chilensis* vía tópica, previa administración i.p. de PRA (0,1 mg/Kg) antagonista adrenérgico $\alpha-1$ en el test tail-flick. * $p < 0,05$

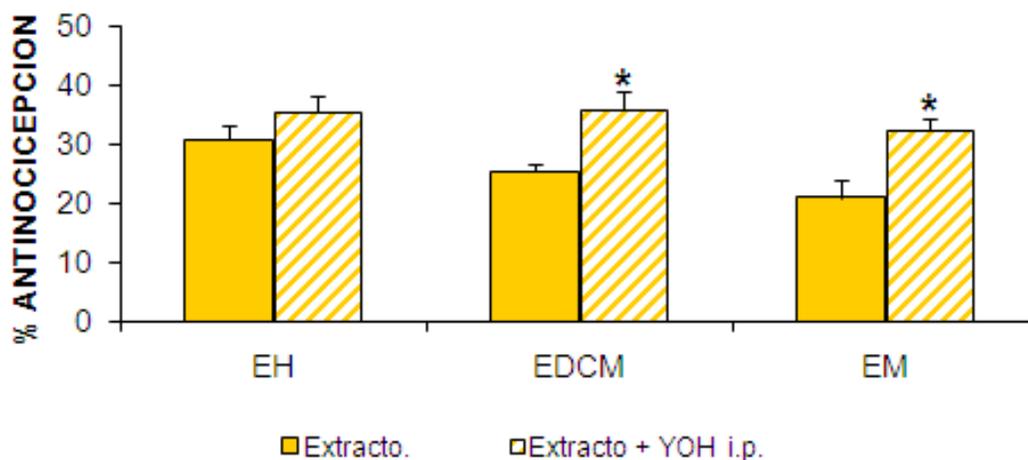


Fig 10. Histograma de efecto analgésico producido por los extractos EH, EDCM y EM de *A. chilensis* vía tópica, previa administración i.p. de YOH (0,01 mg/Kg) antagonista adrenérgico $\alpha-2$ en el test tail-flick. * $p < 0,05$

6.3.4.- Antagonista muscarínico:

Como se observa en la tabla 6 y fig 11, la administración previa de ATRO (1mg/Kg) a los animales causó un incremento significativo en la actividad analgésica de los extractos EH y EM, no así en el extracto EDCM.

Tabla 6 Efectos del pretratamiento con atropina (ATRO) en la actividad antinociceptiva de los extractos de *A. chilensis* en el test tail-flick:

	EH	EDCM	EM
	% MPE	% MPE	% MPE
Extracto (CE ₂₅) _t .	30,62 ± 2,36	25,37 ± 1,30	20,96 ± 2,98
ATRO _{i.p.} + Extracto	42,03± 1,53*	24,66± 3,29	47,58 ± 7,58*

*p<0,05

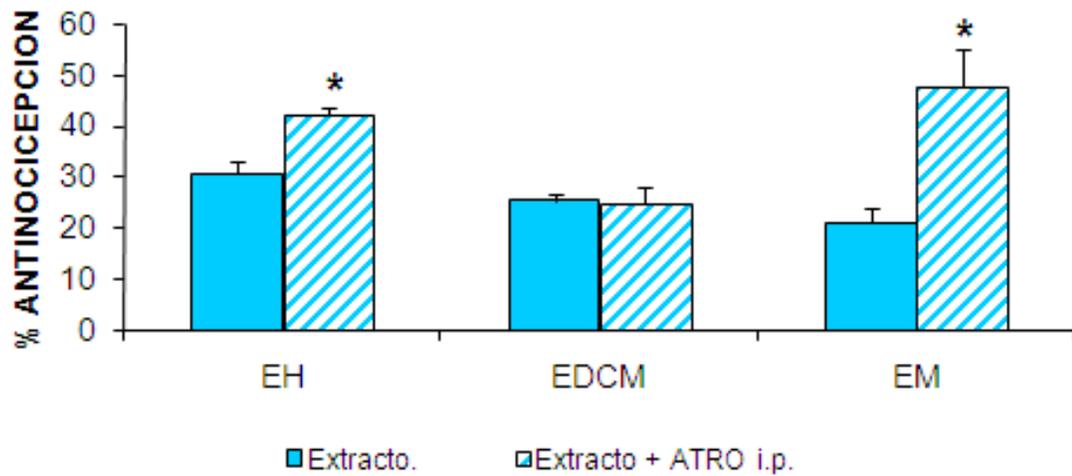


Fig 11. Histograma de efecto analgésico producido por los extractos EH, EDCM y EM de *A. chilensis* vía tópica, previa administración i.p. de ATRO (1 mg/Kg) en el test tail-flick.

*p < 0,05

6.3.5.- Inhibidor de NOS:

El pretratamiento 30 min antes con L-NAME (5 mg/Kg), i.p. aumento significativamente el efecto analgésico de los extractos EH, EDCM y EM en el ensayo de tail flick, como se observa en la tabla 7 y fig. 12.

Tabla 7 Efectos del pretratamiento con L-NAME (5 mg/Kg) en la actividad antinociceptiva de los extractos de *A. chilensis* en el test tail-flick

	EH	EDCM	EM
	% MPE	% MPE	% MPE
Extracto (CE ₂₅) t.	30,62 ± 2,36	25,37 ± 1,30	20,96 ± 2,98
L-NAME i.p. + Extracto	38,65± 1,64*	51,67± 4,86*	35,36 ± 2,95*

*p<0,05

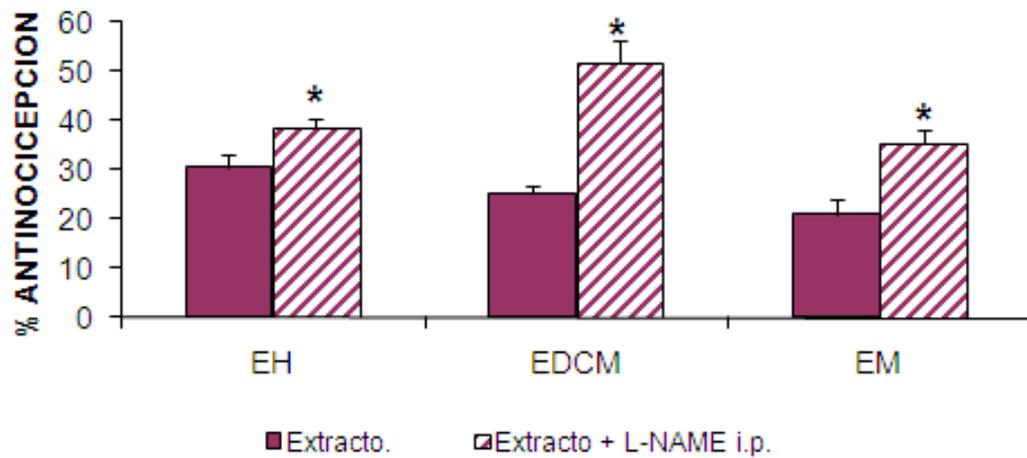


Fig 12. Histograma de efecto analgésico producido por los extractos EH, EDCM y EM de *A.chilensis* vía tópica, previa administración i.p. de L-NAME (5 mg/Kg) en el test tail-flick.

*p < 0,05

CAPITULO VII

DISCUSION

El presente estudio demuestra que los extractos EH, EDCM y EM, de las hojas de *Aristolelia chilensis* producen un efecto analgésico por vía tópica, al utilizar como modelo algesiométrico el ensayo de tail flick, el cual es utilizado para investigar mecanismos de antinocicepción central, debido a que involucra un reflejo espinal (LE-BARS et al, 2001). La estimulación afecta principalmente a los nociceptores de la piel sensibles al calor, sin provocar una respuesta inflamatoria (ZAKARIA et al, 2007). Uno de los componentes fundamentales en la modulación del dolor es el sistema opioide endógeno y la acción analgésica de drogas opioides (BODNAR et al, 2005). Las drogas opioides como la morfina, son el grupo más representativo que actúan a nivel central, sin embargo se ha observado que algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), también participarían a este nivel (PINARDI et al, 2001; MIRANDA et al, 2001, 2002).

La analgesia del extracto EM se vio afectada por NTX y NTI, sugiriendo que estarían involucrados en la antinocicepción, los receptores MOP y DOP del sistema opioide. Mientras que el efecto antinociceptivo de EDCM sólo fue modificado por NTX, lo que sugiere que para este extracto también participaría el sistema opioide mediante los receptores DOP. El hecho que NTX y NTI no puedan revertir el efecto antinociceptivo de los extractos en el ensayo de tail flick, puede ser explicado por lo realizado por POWELL et al, (2002). Ellos encontraron que muy bajas dosis NTX paradójicamente, incrementaría el efecto antinociceptivo de morfina utilizando ensayo de tail flick. La administración previa i.p. de Nor-BNI, no logró modificar el efecto

antinociceptivo de cada extracto, sugiriendo de esta forma que los receptores KOP del sistema opioide no participarían en el efecto analgésico que poseen los extractos de las hojas de *A. chilensis*.

Por otra parte, el incremento en la antinocicepción de los extractos de *A. chilensis* EH y EDCM, por acción de la administración previa de TRO, antagonista selectivo de receptores 5-HT₃, podría explicarse por el efecto modulador positivo que presenta este antagonista (MILLAN, 1999) y por otros efectos que el tropisetron posee en el procesamiento y percepción del dolor, a nivel periférico y central (RIEREING, 2004). Por lo tanto, se sugiere que la acción antinociceptiva de los extractos EH y EDCM serían modulados por el sistema serotoninérgico a nivel central.

El hecho que PRA, antagonista selectivo α 1- adrenoceptor, administrado vía i.p. provocara un incremento significativo en el efecto antinociceptivo en los extractos de maqui EH, EDCM y EM, indicaría que existe participación del sistema adrenérgico mediante la activación y bloqueo de diferentes receptores α 1- postsinápticos ubicados en el SNC e involucrados en el mecanismo de transmisión nociceptiva (TASKER et al. 1992; NICOLL et al. 1990; TJOLSEN et al, 1990), siendo demostrado mediante diversos modelos de antinocicepción como ensayo de formalina (NALEPA et al, 2005), hot-plate, tail flick y contorsiones abdominales (TASKER et al, 1992; MIRANDA et al, 2001). Por lo tanto, se puede señalar que la actividad analgésica de los extractos de maqui serían modulados por el sistema noradrenérgico. El sistema noradrenérgico está involucrado a nivel espinal y supraespinal, por acción de vías inhibitorias descendentes, jugando un rol en la transmisión nociceptiva (PINARDI et al, 2002, MILLAN, 2002). En estudios previos se ha observado que existe supra-aditividad en el efecto antinociceptivo entre AINES, como ketoprofeno, paracetamol y un

antagonista selectivo α 1- adrenoceptor, como el prazosin (PINARDI et al, 2001, MIRANDA et al, 2001, 2008).

Por otra parte, la administración de YOH administrada previamente por vía i.p. modificó la actividad analgésica de los extractos de maqui EDCM y EM, por lo que existiría una participación importante de los α 2-adrenoceptores en la actividad analgésica de *A. chilensis*, teniendo en cuenta que el sistema noradrenérgico es uno de los componentes principales que modula la información nociceptiva (SERRANO-ATERO et al, 2002)

Algunas evidencias han demostrado que el sistema colinérgico es un potencial blanco terapéutico para tratar variados estados de dolor incluyendo, inflamatorio, dolor visceral, dolor neuropático y dolor de artritis (JONES et al, 2007). Algunos trabajos señalan la acetilcolina tendría un rol en la inhibición y modulación de la transmisión de la información nociceptiva (EISENACH,1999; HABERBERGER, 2001). En el SNC la antinocicepción colinérgica puede estar mediada por la activación de receptores muscarínicos postsinápticos ACh-M₁ fundamental para inducir analgesia colinérgica central (GHELARDINI, 2000), ACh-M₂ y ACh-M₃ estos receptores participan en la modulación antinociceptiva a nivel espinal liberando acetilcolina vía un mecanismo de feedback negativo (HOGLUND,1997) siendo el receptor muscarínico un mediador importante para la antinocicepción a nivel espinal y supraespinal. En este caso, se puede observar que existe un rol importante del sistema colinérgico en el efecto antinociceptivo de los extractos EH y EM, debido a que la ATRO antagonista muscarínico no selectivo aumentó significativamente el efecto analgésico de éstos.

Por otro lado, el incremento en la antinocicepción previo tratamiento con L-NAME, indicaría que posiblemente estaría involucrada la vía de L-arginina/NO/cGMP en la antinocicepción causada por los extractos EH, EDCM y EM de *A. chilensis*. Se ha visto que inhibidores de NO/cGMP potencian al actividad antinociceptiva de morfina (XU & TSENG 1997; ZHU & BARR,2001). Algunos estudios demuestran que L-NAME tendría una acción antinociceptiva periférica y central per se y que actuaría por estimulación de la vía de L-arginina/NO/cGMP, no así N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) otro inhibidor de NO sintasas (DUARTE et al, 2000; MOORE et al, 1991). El NO participa a varios niveles del sistema nervioso tanto central como periférico, en el proceso nociceptivo. Funcionalmente, muchos reflejos nociceptivos involucran la interacción de NO y los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), que se activan acción del ácido glutámico (ESPLUGUES,2002).

Finalmente, en estudios fitoquímicos previos se han aislado una gran variedad de compuestos biológicamente activos a partir de las hojas de *A. chilensis* los que actuarían sinérgicamente para ejercer la actividad analgésica, como por ejemplo: triterpenos, flavonoides (quercetina), cumarinas (escopoletina), esteroides (β -sitosterol), alcaloides (indólicos, quinolínicos e isoquinolínico) entre otros.

Los flavonoides que se encuentran en altas concentraciones en las hojas de *A. chilensis* jugarían un rol importante en la actividad analgésica de los extractos. Estudios previos señalan que los flavonoides son potentes inhibidores de la NOS (OLSZANECKI et al, 2002), esta enzima participa en la síntesis de NO que está vinculada con la antinocicepción (FERREIRA et al.,1991; MACHELSKA et al.,1997).También se ha demostrado que la actividad antinociceptiva de flavonoides y triterpenos, tiene relación con el

bloqueo de la proteína tirosina kinasa C (OBLAK et al., 2000), que participa en la cascada de los eventos moleculares que conducen a la expresión de NOS causando una inhibición en la vía L-arginina/NO (MEOTTI et al., 2005 ; OTUKI et al., 2005).

La protopina, alcaloide isoquinolínico con múltiples acciones farmacológicas como: vasodilatador (LI et al, 2005), antitrombótico y antiinflamatorio (SAEED et al, 1997) también se le ha identificado como un inhibidor de transporte de serotonina y noradrenalina en ensayos in vitro (XU et al, 2006), por lo que podría ser un potencial agente terapéutico como antidepresivo y analgésico. Existen evidencias que algunos antidepresivos inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS) y tricíclicos (YOKOGAWA et al, 2002; LYNCH et al, 2006; JONES et al, 2005) presentan efectos antinociceptivos, por lo que se sugiere que este metabolito jugaría un rol importante en la analgesia presentada por los extractos.

Por otra parte, la escopoletina también sería responsable de la antinocicepción producida por los extractos. Estudios recientes indican que la escopoletina tiene propiedades: antioxidantes, antiinflamatorias y analgésicas (MUSCHIETTI et al, 2001; NG et al, 2003) inhibiendo la respuesta nociceptiva y siendo aproximadamente 400 veces más potente que el paracetamol y la aspirina, según en ensayo de contorsiones abdominales inducidas por ácido acético (MEOTTI et al, 2006).

Por la variedad de alcaloides indólicos aislados de las hojas de *A. chilensis* es posible relacionar la participación de estos metabolitos con la acción analgésica que presentan los extractos.

CAPITULO VIII

CONCLUSIÓN

- En este estudio se comprobó que la aplicación vía tópica de los diferentes extractos (EH, EDCM y EM) de *Aristolelia chilensis* producen una actividad antinociceptiva en el modelo de latigazo de la cola y que ese efecto está mediado por mecanismos centrales y periféricos.
- La administración i.p. conjunta de antagonistas con extractos de *A. chilensis* por vía tópica no antagonizaron el efecto analgésico, sino que mantuvieron o provocaron un incremento significativo en la actividad antinociceptiva de los extractos, esto puede deberse a la variedad estructural de metabolitos secundarios presentes en cada extracto, causando antinocicepción por diversos y complementarios mecanismos.
- La actividad analgésica de EH al ser afectada por los antagonistas TROPI, PRA, ATRO, L-NAME, nos señala que estaría modulada por receptores serotoninérgicos (5-HT₃), adrenérgicos (α -1), colinérgico muscarínico (ACh-M) y vía NO/cGMP respectivamente.
- La actividad antinociceptiva de EDCM es modulada por las vías opioide, serotoninérgicas, adrenérgicas y nitridérgicas, debido a que su efecto analgésico se vio afectado por los antagonistas NTX, TRO, PARA, YOH y L-NAME.

- En el efecto analgésico de EM estarían involucrados los sistemas opioide, adrenérgico, colinérgico muscarínico y L-arginina/NO, debido a que modificaron su efecto antinociceptivo los antagonistas NTX, NTI, PRA, YOH, ATRO y L-NAME

- El presente estudio confirma las propiedades analgésicas de los diferentes extractos obtenidos de las hojas de *Aristolelia chilensis*.

CAPITULO IX BIBLIOGRAFIA

- ARMANDO C. Obtención de alcaloides indólicos tipo aristotelia desde *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz. (Maqui). Memoria para optar el grado de Doctor en Ciencias con mención en Química. Concepción. Chile. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Químicas. 1996.
- AVELLO M., VALLADARES R., ORDOÑEZ J. Antioxidant capacity of *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2008. 13(4).
- BHAKUNI DS, SILVA M, MATLIN SA, SAMMES PG. Phytochemistry. 1976. 15:574-575
- BENARROCH E. Dolor: conceptos emergentes en fisiología y fisiopatología. Rev. Neurol. Argen. 2005. 30: 70-82
- BITTNER M., et al. Indole alkaloids from *Aristotelia chilensis*. J.Chem. Soc. Commun. 1978. 79-80 p.
- BODNAR RJ., KLEIN GE. Endogenous opiates and behavior. Peptides. 2005. 26:2629-2671
- CÉSPEDES C., et al. New Alkaloids from *Aristotelia chilensis*. Phytochemistry. 1990. 29: 1354-1356.
- CÉSPEDES C. et al. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry*, 2008.107:820-829.

- DOGRUL A., et al. The local antinociceptive actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the mouse radiant heat tail-flick test. *Anesth. & analg.* 2007. 104: 927-935
- DUARTE I.D.G., FERREIRA S.H. L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. *Mediators of Inflammation*. 2000. 9: 25–30
- EISENACH J.C. Muscarinic-mediated analgesia. *Life Sci.* 1999. 64:549-554.
- ESCRIBANO-BAILÓN, M.T. “et al”. Anthocyanins in berries of maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz). *Phytochemical Analysts*, 2006. 17:8-14
- ESPLUGUES J.V. NO as a signaling molecule in the nervous system. *British Journal of Pharmacology*. 2002. 135:1079-1095.
- FERREIRA, S.H., DUARTE, I.D.G., LORENZETTI, B.B.. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.* 1991. 201: 121–122.
- GHELARDINI C., GALEOTTI N., BARTOLINI A. Loss of muscarinic antinociception by antisense inhibition of M1 receptors. *Br. J. Pharm.* 2000. 129: 1633-1640.
- GOPALAKRISHNA EM, et al. *Acta Cryst.* 1978. B34: 3778-3780.
- HABERBERGER R., et al. M2-receptor subtypes does not mediate muscarine-induced increases in Ca^{+2} in nociceptive neurons of rat dorsal root ganglia. *J. Neurophysiol.* 2001. 84:1934-1941
- HEYWOOD V, et al. *Butenpflanzen der Welt*. Birkhauser Verlag. 1978. 98p.

- HOFFMANN, E. Flora Silvestre de Chile. Zona Araucana. Ed. Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile. 1997. 257 p.
- HOGLUND A.U., BAGHDOYAN HA, M2, M3 y M4, but not M1 muscarinic receptor subtypes are present in rat spinal cord. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. 281 : 470-477
- JONES C, PETERS C, SHANNON H. Efficacy of Duloxetine, a Potent and Balanced Serotonergic and Noradrenergic Reuptake Inhibitor, in Inflammatory and Acute Pain Models in Rodents. The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2005. 312:726-732.
- JONES PG, DUNLOP J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. Neuropharmacology. 2007. 53: 197-206.
- LE BARS D., GOZARIU M., CADDEN S. Animal models of nociception. Pharmacol. Rev. 2001. 53: 597-652.
- LI B. et al. Effects of protopine on intracellular calcium and the PKC activity of rat aorta smooth muscle. 2005. 57:240-246
- LYNCH M, WATSON C. The pharmacotherapy of chronic pain: A review. 2006. Pain Res Manage Vol 11 No 1
- MACHELSKA, H. et al. Inhibition of nitric oxide synthase enhances antinociception mediated by *mu*, *delta* and *kappa* opioid receptors in acute and prolonged pain in the rat spinal cord. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. 282: 977–984.
- MEOTTI, F.C., et al. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin. Evidence for a role of the Larginine- nitric oxide and protein kinase C pathways. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. 316: 789–796.

- MEOTTI F.C., et al. Antinociceptive properties of coumarins, steroids and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2006. 58: 107-112
- MILLAN MJ. Descending control. *Pain. Prog. Neurobiol.* 2002. 66:355-474.
- MIRANDA H.F., SIERRALTA F., PINARDI G. An isobolographic analysis of the adrenergic modulation of diclofenac antinociception. *Anesth. Analg.* 2001. 93: 430-435
- MIRANDA H.F., SIERRALTA F., PINARDI G. Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs. *Brit. Journal Pharmacol.* 2002. 135: 1591-1597
- MIRANDA HF, et al. Isobolographic analysis of multimodal analgesia in an animal model of visceral acute pain. *Pharmacol. Biochem. Behavior* . 2008. 88:481-488.
- MIRANDA-ROTTMANN, S. "et al". Juice and phenolic fractions of the berry *Aristotelia chilensis* inhibit LDL oxidation *in vitro* and protect human endothelial cells against oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. 50: 7542-75-47
- MOLARES S, LADIO A. Ethnobotanical review of the Mapuche medicinal flora: Use patterns on regional scale. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009 122: 251-260
- MOORE P.K, et al. L-N_G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*1991.102:198-202

- MORÓN et al. Farmacología General. La Habana. Ed Ciencias Médicas. Cuba. 2002.3p
- MUÑOZ, O. Química de la flora de Chile. Santiago, Chile. , 1992. 153-164p.
- MUÑOZ, O., MONTES, M., WILKOMIRSKY T. Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. Santiago, Chile. Ed.Universitaria, 2001. 45p.
- MUÑOZ O., DELPORTE C., BACKHOUSE N., ERAZO S., MIRANDA H.F., ALEGRÍA S. Protopina, inusual alcaloide de *Aristolelia chilensis*. En: VI Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, 24 - 26 octubre 2007, Chillán – Chile. pp.s.p.
- MUSCHIETTI L, et al. Phenolic compounds with antiinflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. Planta Med. 2001. 67:743-74
- NG et al. Antioxidant activity compunds from the medicinal herbal *Aster tataricus*. Comp.Biochem.Physiol.C.Toxicol.Pharmacol. 2003. 136:109-115
- NICOLL RA., MALENKA RC., KAUER J.A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. Physiol.Rev. 1990. 70: 513-565
- OBLAK, M., RANDIC, M., AND SOLMAJER, T. Quantitative structure-activity relationship of flavonoid analogues. 3. Inhibition of p56lck protein tyrosine kinase. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2000. 40: 994–1001.
- OLSZANECKI, R.,et al. Flavonoids and nitric oxide synthase. J. Physiol. Pharmacol. 2002. 53: 571–584.

- OTUKI M.F., et al. 2005. Antinociceptive properties of mixture of a-amyrin and b-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313: 310–318.
- PINARDI G., SIERRALTA F., MIRANDA H.F. Interaction between the antinociceptive effect of ketoprofen and adrenergic modulatory system. *Inflammation.* 2001. 25:233-239
- PINARDI G., SIERRALTA F., MIRANDA H.F. Adrenergic mechanisms in antinociceptive effects of non steroidal anti-inflammatory drugs in acute thermal nociception in mice. *Inflammation Rev.*2002. 51: 219-222
- POWELL et al. Paradoxical effects of the opioid antagonist naltrexone on morphine analgesia, tolerance and reward in rats. *Pharmacology and Experiment. Therap.* 2002. 300: 588-596
- RIERING K., REWERTS C., ZIEGLGANSBERGER W. Analgesic effects of 5-HT3 receptor antagonist. *Scandinavian Journal of Rheumatology Supplement.* 2004. 119: 19-23
- RODRIGUEZ, G., RODRÍGUEZ, R., Y BARRALES, H.L. Plantas ornamentales chilenas. Concepción, Chile. Ed. Aníbal Pinto S.A, 2004. 38p.
- SAEED SA., et al. Anti-thrombotic and antiinflammatory activities of protopine. *Pharmacol. Res.* 1997. 36:1-7
- SERRANO-ATERO M.S. et al. Modulación descendente de la información nociceptiva (I). *Rev. Soc. Esp. Dolor.* 2002. 9: 382-390.
- SILVA M, et al. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. Gupta M.P. Editor. Presencia Ltda. Colombia.1995. 261 p.

- SUWALSKY M, et al. Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of *Aristolelia chilensis* (Maqui) leaves. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008. 363: 85-90
- TASKER R.A., CONNELL B.J., YOLE M.J. Systemic injections of alpha-1 adrenergic agonists produce antinociception in the formalin test. *Pain*. 1992. 49:383-391
- TJONSEN A., LUND A., HOLE K. The role of descending noradrenergic systems in regulation of nociception: the effect of intrathecally administered alpha-receptor antagonist and clonidine. *Pain*. 1990. 43: 113-120.
- TORRES R., COMIN JH. Algunos constituyentes de las hojas de *Aristolelia chilensis* (Mol) *Stuntz.Rev. Contribuciones* 1975 N° 16. 25p. U. Técnica del Estado. Santiago de Chile.
- TORRES V. Evaluación de las actividades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobinas de las hojas de *Aristolelia chilensis* y sus potenciales efectos tóxicos. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago. Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2007. 35p
- WATSON WH., et al. *Acta Crystallogr*. 1989. C. 45.1322-1324.
- WHALDHOER M, "et al". Opiod receptors. *Annu. Rev. Biochem*. 2004. 73:953–990
- XU L., et al. Protopine inhibits serotonin transporter and noradrenaline transporter and has the antidepressant-like effect in mice models. *Neuropharmacology*. 2006. 50: 934-960.

- YOKOGAWA F. et al. An Investigation of Monoamine Receptors Involved in Antinociceptive Effects of Antidepressants. *Anesth Analg.* 2002. 95:163–168
- ZAKARIA Z. et al. The antinociceptive action of aqueous extract from *Muntingia calabura* leaves: The role of opioid receptors. *Med Princ Pract* 2007. 16:130-136.
- ZHU H., BARR G.A. Opiate withdrawal during development: are NMDA receptors indispensable? *Trends. Pharmacol. Sci.* 2001. 22: 404-408