

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ANTINOCICEPTIVA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Justicia spicigera* Y NAPROXENO

González Prado Hugo Israel (1), Zapata Morales Juan Ramón (2), Alonso Castro Angel Josabad (3), Ramírez Morales Marco Antonio (4)

1 [Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [hi.gonzalezprado@ugto.mx]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [mzrj@hotmail.com]

3 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [angeljosabad@hotmail.com]

4 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [marco.ramirezmo@hotmail.com]

Resumen

La búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento del dolor ha iniciado la incursión de utilizar combinaciones para potenciar el efecto de cada uno de los componentes y tratar de disminuir los efectos adversos. Con este planteamiento el objetivo del presente estudio fue evaluar la interacción antinociceptiva del extracto etanólico de *Justicia spicigera*, una planta con múltiples usos medicinales y naproxeno, un analgésico, antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Para ello se empleó la prueba de la formalina como modelo de inducción de nocicepción. Se seleccionaron grupos de ratas Wistar, los cuales fueron tratados previamente con diferentes dosis de naproxeno y *J. spicigera* para obtener la dosis efectiva 50 de manera individual y de la combinación de las DE₅₀ de las mismas. Posteriormente fueron analizados en base al % de antinocicepción y el análisis isoblográfico. Los resultados muestran una disminución en el % de antinocicepción en la fase dos (dolor inflamatorio) del modelo de formalina, así como un índice de interacción de 0.594, el cual indica un sinergismo de tipo potenciación.

Abstract

The search of new pharmacological alternatives for the treatment of pain has begun the incursion of using combinations to enhance the effect of each of the components and try to decrease the adverse effects. With this approach the aim of the present study was to evaluate the antinociceptive interaction of the ethanolic extract of *Justicia spicigera*, a plant with multiple medicinal uses and naproxen, an analgesic, nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). For this purpose, the formalin test was used as a nociception induction model. Groups of Wistar rats were selected, which were previously treated with different doses of naproxen and *J. spicigera* to obtain the effective dose 50 individually and the combination of the ED 50 of the same. Subsequently, they were analyzed based on % of antinociception and isobolographic analysis. The results show a decrease in the % of antinociception in phase two (inflammatory pain) of the formalin model, as well as an interaction index of 0.594, which indicates a potentiation type synergism.

Palabras Clave

J. spicigera; Naproxeno; Formalina; Isoblograma; Sinergismo.

INTRODUCCIÓN

El dolor es definido como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de tal daño. [1]. Para el tratamiento del dolor existen diversos fármacos, como los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), fármacos analgésicos más utilizados, con aproximadamente 30 millones de usuarios en todo el mundo [2]. Uno de los AINEs más representativos es el naproxeno, prescrito para tratar el dolor o la inflamación causada por enfermedades como la artritis, la espondilitis anquilosante, la tendinitis, la bursitis, la gota o los calambres menstruales [3].

Mediante la inhibición de múltiples vías del dolor, la combinación de analgésicos puede proporcionar una mayor eficacia y reducir los efectos adversos que pudiesen presentarse con la utilización de fármacos por separado. Farmacológicamente, cuando la interacción da lugar al aumento del efecto de uno o de los dos fármacos se habla de efecto sinérgico. A su vez, el concepto contrario a la sinergia es el antagonismo. Dos fármacos son antagonistas cuando la interacción da lugar a una disminución de los efectos de uno o ambos fármacos [4].

Justicia spicigera, conocida comúnmente como “muicle” o “muitle”, es una planta que ha sido utilizada en México desde la época prehispánica con diferentes usos medicinales, como el alivio de malestares intestinales, fiebre, inflamación, entre otros propósitos. Además de México, la presencia de la planta se extiende hasta Suramérica, lo que la hace popular en la medicina tradicional. La planta fresca tiene un color verde brillante; sin embargo, muestra tonos “liliáceos” (del lat. *Liliacēus*, típico del lirio) o violeta [Pavón-García et al., 2011] que aparecen hasta que se hacen extracciones, ya sea con agua o mezclas de disolventes como el etanol [5].

Si bien la evaluación del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *J. spicigera* ha sido realizada por nuestro grupo de trabajo [6], la interacción con otros fármacos aún no ha sido descrita.

Es posible que con la utilización de combinaciones de fármacos conocidos para el tratamiento del dolor con extractos de plantas naturales se pueda

lograr un mayor efecto farmacológico que el que se obtiene con la administración de forma individual por separado.

El presente proyecto tuvo como objetivo la determinación de la interacción antinociceptiva del extracto etanólico de *Justicia spicigera* y naproxeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El naproxeno fue adquirido directamente de Sigma Aldrich y el extracto etanólico de *Justicia spicigera* fue donado por la Dra. Candy Carranza Álvarez de la UASLP.

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 8 semanas de edad de un peso de entre 200 y 250 g del bioterio de la Universidad de Guanajuato, las ratas se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada con ciclos de luz / oscuridad de 12 h con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a lo establecido en la NOM 062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) y de acuerdo con las recomendaciones de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (Zimmerman, 1983).

Evaluación de la actividad antinociceptiva

Para la evaluación de la actividad antinociceptiva se utilizó el modelo de la formalina. El modelo se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Dubuisson y Dennis en 1977 [7]. Las Ratas fueron divididas en grupos de 6. Previo tratamiento, los animales fueron ambientados en cilindros de acrílico, durante una hora al menos por 3 días previos y el día del experimento. Las dosis fueron administradas (v.o) a los grupos de animales de acuerdo al siguiente orden: (I) Naproxeno 50

mg/Kg; (II) Naproxeno 100 mg/Kg; (III) Naproxeno 200 mg/Kg; (IV) Naproxeno 300 mg/Kg; (V) *J. spicigera* 30 mg/kg; (VI) *J. spicigera* 100 mg/kg; (VII) *J. spicigera* 150 mg/kg; (VIII) *J. spicigera* 200 mg/kg. Como control se empleó otro grupo de 6 ratas (IX), al cual se le administró solución salina como vehículo en lugar de tratamiento.

Una hora después de la administración de las dosis, las ratas fueron inyectadas con 50 µL de formalina al 5% en el espacio intraplantar de la pata derecha. Posteriormente fueron colocadas en cilindros de acrílico. La reacción del dolor (sacudidas de la pata inducidas por la inyección de formalina) fue contabilizada en dos periodos, 0–15 min (dolor neurálgico) y 15–61 min (dolor inflamatorio), para esto se contabilizó durante 1 minuto por cada 5 minutos.

Posteriormente se calculó la Dosis Efectiva 50 (DE₅₀) de cada tratamiento. Se evaluó el efecto de las combinaciones considerando la DE₅₀ de cada tratamiento antes descrito y bajo las diluciones (Naproxeno/*J. spicigera*) siguientes: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8. El modelo de formalina se aplicó de igual forma en grupos de 6 ratas para cada una de las diluciones.

El porcentaje de antinocicepción fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Antinocicepción} = \left(\frac{\text{No. de sacudidas del vehículo} - \text{No. de sacudidas de tratamiento}}{\text{No. de sacudidas del vehículo}} \right) \times 100$$

Análisis de datos

Empleando regresión lineal se determinó la Dosis Efectiva 50 (DE₅₀) teórica. Los datos son presentados como la media ± el error estándar de la media (EEM). Para el análisis estadístico de los datos se realizó un ANOVA y una prueba pos hoc de Dunnett. Se considero estadísticamente significativos valores de P<0.05. Todos los cálculos se realizaron con el programa NCSS versión 8.

Los resultados del estudio de la combinación del extracto y del fármaco fueron analizados mediante análisis isoblográfico. Los valores de la DE₅₀ teórica (± error estándar) fueron comparados con la DE₅₀ experimental mediante una prueba t-student. El grado de interacción farmacológica se

determinó por medio del índice de interacción (γ) que es una medida cuantitativa de la interacción entre dos fármacos. Valores cerca de 1 indican una interacción aditiva, mientras que valores más grandes que 1 implican una interacción antagónica y valores menores que 1 indican una potenciación [8]. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando p<0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto antinociceptivo de naproxeno se estableció en un valor de DE₅₀ 226.21 mg/kg, mientras que el de *J. spicigera* fue de 121.15 mg/Kg. (Figura 1 y 2).

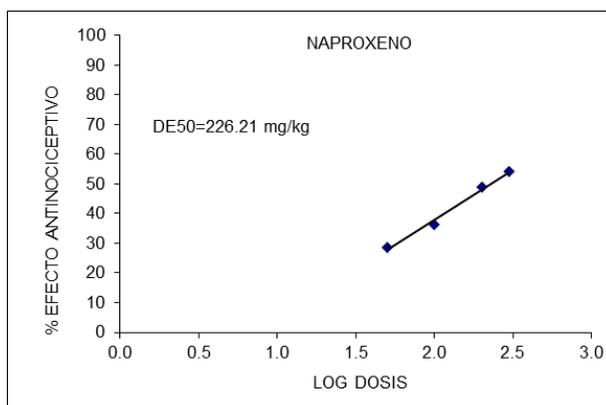


FIGURA 1. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo de Naproxeno en la fase 2 del modelo de la formalina en ratas.

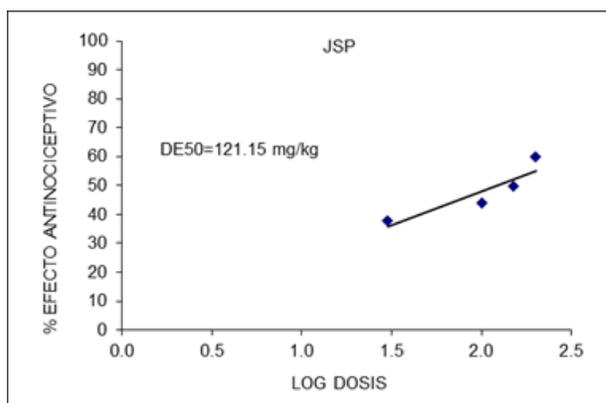


FIGURA 2. Curva dosis-respuesta del efecto antinociceptivo del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en la fase 2 del modelo de la formalina en ratas.

En la evaluación del efecto antinociceptivo de *J. spicigera* en combinación con naproxeno en el modelo de la formalina. En la primera fase (0–15 min) refleja dolor neurológico o neurogenico, siendo implicados la sustancia P, bradicinina, histamina y serotonina [9]. En esta fase la combinación 3 (1:2) obtuvo el mayor porcentaje de antinocicepción, un valor de 56.51 ± 14.69 (Figura 3).

En la segunda fase (15–61 min), la más importante de este modelo para nuestros fines de estudio, se refleja un dolor de tipo inflamatorio debido a la producción y liberación de diversos mediadores de la inflamación, como histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas, taquicininas, glutamato, entre otros [10]. Los resultados de la fase 2 presentaron una dependencia del tipo dosis–efecto. La combinación 4 (1:1) obtuvo el mayor porcentaje de antinocicepción 56.56 ± 266 . (Figura 4).

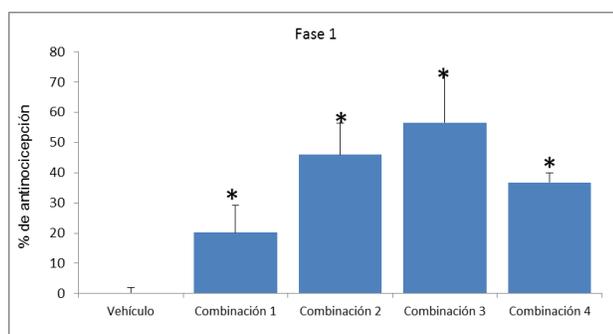


FIGURA 3. Efecto antinociceptivo en la fase 1 de las combinaciones entre el extracto etanólico de *J. spicigera* y Naproxeno en el modelo de la formalina en ratas combinación 1= 21.71 mg/kg, combinación 2= 43.42 mg/kg, combinación 3 = 86.84 mg/kg y combinación 4 =173.68 mg/kg. Las barras verticales representan el promedio \pm EEM (* P < 0.05 vs vehículo).

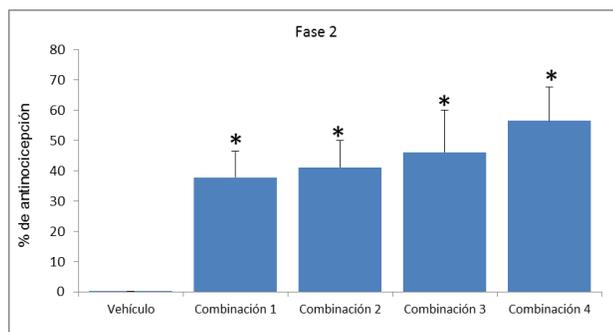


FIGURA 4. Efecto antinociceptivo en la fase 2 de las combinaciones entre el extracto etanólico de *J. spicigera* y Naproxeno en el modelo de la formalina en ratas combinación 1= 21.71 mg/kg, combinación 2= 43.42 mg/kg, combinación 3 = 86.84 mg/kg y combinación 4 =173.68 mg/kg. Las barras verticales representan el promedio \pm EEM (* P < 0.05 vs vehículo).

Estos resultados indican que la combinación entre *J. spicigera* y naproxeno tiene efecto antinociceptivo en la fase 2 del modelo de formalina, correspondiente al dolor inflamatorio. En cuanto al naproxeno, ha sido descrita una disminución en dicha fase empleando una dosis de 200 mg/kg, por [Karim et al., 1993], [11], mientras que [Zapata-Morales et al., 2016], reportan una disminución de dolor en la fase antiinflamatoria para *J. spicigera* en dosis de 100 y 200 mg/kg en ratón; no obstante para la combinación entres ellos no había sido reportada en ninguna investigación.

La DE_{50} experimental para la combinación fue de 103.12 mg/kg, un valor menor a la DE_{50} teórica con un valor de 173.68 mg/kg.

En lo que respecta al análisis isoblográfico, en el presente estudio al evaluar el tipo de interacción farmacológica existente entre *J. spicigera* y naproxeno, el valor experimental de la DE_{50} experimental se encuentra por debajo de la línea de adición, lo que significa una diferencia con la DE_{50} teórica, que a su vez nos indica un efecto sinérgico (Figura 5).

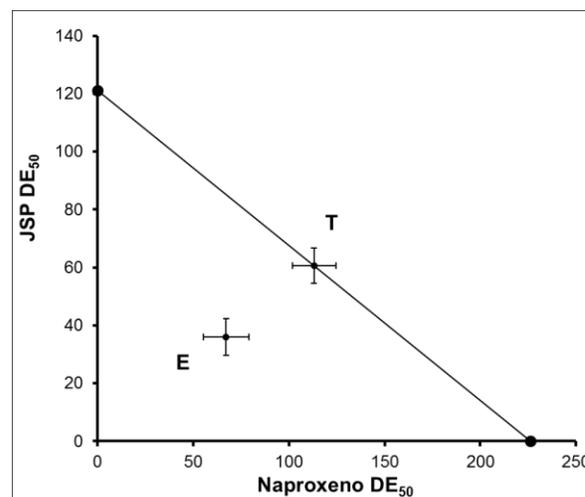


FIGURA 5. Isoblograma de la interacción de la combinación entre el extracto etanólico de *J. spicigera* y Naproxeno en el efecto antinociceptivo del modelo de formalina, E = dosis experimental (103.12 mg/kg) y T = dosis teórica (173.68 mg/kg).

Al realizar el cálculo para el índice de interacción, el valor obtenido es de 0.594, que se encuentra por debajo de 1, por lo que indica una interacción sinérgica de tipo potenciación, que representa un incremento en la actividad farmacológica de ambos componentes para el tratamiento del dolor al combinarse.

A nivel farmacológico la presencia de un sinergismo de tipo potenciación se debe a la diferencia de mecanismos de acción entre los fármacos administrados, contribuyendo así al afecto antinociceptivo. En el caso de naproxeno se sabe que actúa inhibiendo la ciclooxigenasa (COX-1 y COX 2), la cual es responsable a su vez de la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, que participan directamente sobre la regulación del dolor [12].

Previos estudios de *J. spicigera* han encontrado la presencia de kaempferol, kaempferol-3, 7-bisrhamnósido (kaempferitrina), criptoxantina, alantoina y β -glucosil-o-sistosterol [13]; sin embargo el mecanismo antinociceptivo de *J. spicigera* aún no ha sido descrito, por lo que es importante que en estudios posteriores se evalúe el mecanismo de acción de *J. spicigera* y su combinación con naproxeno.

Este estudio contribuye de manera importante a la evaluación de interacciones farmacológicas de la combinación entre un extracto de origen natural y un fármaco conocido para el tratamiento del dolor. Si bien la investigación continua, los resultados obtenidos hasta ahora contribuyen de forma preponderante al estudio de nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento del dolor. Con gran expectativa podrán desarrollarse en un futuro las formas farmacéuticas correctas para su administración.

CONCLUSIONES

La evaluación del efecto antinociceptivo de la combinación farmacológica de naproxeno y *Justicia spicigera* demostró una disminución de la nocicepción en el modelo de formalina.

La combinación de naproxeno y *Justicia spicigera* presentó una interacción sinérgica de tipo potenciación.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo con fondos del proyecto de Investigación Científica Básica 2015 de CONACYT con número 257872 otorgados al Dr. Juan Ramón Zapata Morales.

Uno de los autores HIGP, agradece a la Dirección de Apoyo a la Investigación y el Posgrado de la Universidad de Guanajuato, a través del programa "Veranos de Investigación UG 2017" por la beca recibida para la realización de la estancia.

Al Sr. Juan Pedro Galván Chía, encargado del Bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato por el apoyo técnico en el desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS

- [1] International Association for the Study of Pain, IASP Taxonomy. (2012). Recuperado de <https://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Pain>.
- [2] Singh G (2000). Gastrointestinal complications of prescription and over-the-counter nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a view from the ARAMIS database: arthritis, rheumatism, and aging medical information system. *Am J Ther.* 7(2):115-21.
- [3] Drug.com Cerner Multum. Naproxen. What is naproxen? (2017). 14.01. Recuperado de: <https://www.drugs.com/naproxen.html>.
- [4] Raffa R. B. (2001). Pharmacology of oral combination analgesics. *Rational therapy of pain, J. Clinical Pharmacy and Therapeutics.* 26(4): 257-264.
- [5] Pavón-García, L. M., Pérez-Alonso, C., Orozco-Villafuerte, M., Pimentel-González, D. J., Rodríguez-Hueso, E., & Vernon-Carter, E. J. (2011). Storage stability of the natural colorant from *Justicia spicigera* microencapsulated in protective colloids blends by spray-drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1428-1437.
- [6] Zapata-Morales, J., Alonso-Castro, A., Domínguez, F., Carranza-Álvarez, C., Castellanos, L., Martínez-Medina, R. and Pérez-Urizar, J. (2016). Antinociceptive Activity of an Ethanol Extract of *Justicia spicigera*. *Drug Development Research*, 77(4), pp.180-186.
- [7] Dubuisson, D. and Dennis, S. (1977). The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(Supp C), pp.161-174.

- [8] Isiordia, M., Pozos, A., Aguirre, P., Pérez, J. (2010). Isobolographic analysis of the analgesic combination systemic ketorolac and local tramadol in the formalin test in mice. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(2), pp. 42-49.
- [9] Munro, G. (2007). Dopamine D1 and D2 receptor agonism enhances antinociception mediated by the serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor duloxetine in the rat formalin test. *European Journal of Pharmacology*, 575(1-3), pp.66-74.
- [10] Fujimaki, H., Kawagoe, A., Bissonnette, E., Befus, D. (1992). Mast cell response to formaldehyde. 1. Modulation of mediator release. *Int Arch Allergy Immunol*, 98(4):324-31.
- [11] Karim, F., Kanui, T., Mbugua, S. (1993). Effects of codeine, naproxen and dexamethasone on formalin-induced pain in the naked mole-rat. *Neuroreport*, 4(1):25-8.
- [12] Katzung, B. (2013). *Basic and Clinical Pharmacology* (11va Ed.). Norwalk: McGraw-hill Educ Medical, (pp.531-553).
- [13] Euler, K. and Alam, M. (1982). Isolation of Kaempferitrin From *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*, 45(2), pp.220-221.