

Evaluación de la actividad antinociceptiva e interacción farmacológica de *Momordica Charantia* con diclofenaco

Villanueva Lopez Marco Polo¹, Perales Rocha Angel Ernesto², Martinez Espinosa Maria Guadalupe³, Rosas Arroyo Jose Angel⁴, Angeles Torres Jose Guillermo⁵, Magno Palerno Cecilia Patricia, Zapata Morales Juan Ramón⁶.

^{1,2,4,5,6} Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, ³ Lic. Biología Experimental, Universidad de Guanajuato

⁶Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato

mp.villanuevalopez@ugto.mx¹

ae.peralesrocha@ugto.mx²

mg.martinezepinosa@ugto.mx³

ja.rosasarroyo@ugto.mx⁴

jg.angelestorres@ugto.mx⁵

cp.magnopaleo@ugto.mx⁶

juan.zapata@ugto.mx⁷

Resumen

El dolor es un síntoma frecuente, se origina con un estímulo nocivo y causa una reacción inmediata de alarma, en algunos casos da como resultado un proceso inflamatorio. Para su tratamiento se utilizan antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y opioides, sin embargo, estos compuestos presentan efectos colaterales. Por tal motivo es importante continuar buscando moléculas que pudieran tener efecto analgésico y/o antiinflamatorio igual o mejor que los fármacos que se utilizan actualmente, pero con menores efectos colaterales. Las plantas medicinales, frutos y moléculas extraídas de plantas o frutas presentan propiedades antiinflamatorias y analgésicas. Con este planteamiento, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antinociceptivo de un extracto etanólico de *Momordica charantia* y su interacción de farmacológica con el diclofenaco. Para ello se empleó el test de formalina como modelo de inducción de nocicepción. Se seleccionaron grupos de ratones, que fueron tratados previamente con diferentes dosis del extracto de *momordica charantia* para obtener la dosis efectiva 50 (DE₅₀) de manera individual. Posteriormente fueron analizados en base al % de antinocicepción. Los resultados muestran una DE₅₀ de 65.61 mg/kg en la fase 2 del extracto de *Momordica charantia*.

Palabras clave: dolor, AINEs, opioides, *momordica charantia*, efecto antinociceptivo, DE₅₀

Abstract

Pain is a frequent symptom, it originates with a noxious stimulus and causes an immediate alarm reaction, in some cases resulting in an inflammatory process. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioids are used for its treatment; however, these compounds present side effects. For this reason, it is important to continue searching for molecules that could have the same or better analgesic and/or anti-inflammatory effect than the drugs currently used, but with less side effects. Medicinal plants, fruits and molecules extracted from plants or fruits present anti-inflammatory and analgesic properties. With this approach, the aim of the present study was to evaluate the antinociceptive effect of an ethanolic extract of *Momordica charantia* and its pharmacological interaction with diclofenac. For this purpose, the formalin test was used as a nociception induction model. Groups of mice were selected and pretreated with different doses of *Momordica charantia* extract to obtain the effective dose 50 (DE₅₀) individually. They were then analyzed on the basis of % antinociception. The results show a DE₅₀ of 65.61 mg/kg in phase 2 of *Momordica charantia* extract.

Introducción

La Asociación Internacional para el Estudio del dolor (IASP, por sus siglas en inglés), define al dolor como una experiencia sensorial desagradable proveniente de una lesión potencial o real, en la cual genera una serie de reacciones motoras del organismo, desencadenando un aprendizaje de evitar estas sensaciones generando comportamientos en las

especies.^[4] El dolor es la causa más frecuente de consulta médica y el motivo más habitual de solicitud de medicamentos sin receta, ya que su mecanismo de defensa, consta de detectar y localizar los procesos que dañan las estructuras corporales, y se clasifica en función de diversos criterios, tales como: según su duración: dolor agudo y dolor crónico; según su origen: dolor nociceptivo, dolor neuropático y dolor psicógeno; según su localización; según su curso; según su intensidad; y según su sensibilidad al tratamiento.^[6]

A partir del tratamiento farmacológico, se utilizan los analgésicos, tales como los AINEs, los cuales son de primera elección en el dolor nociceptivo, especialmente cuando existe un componente inflamatorio^[6]. Los analgésicos poseen la habilidad de reducir los síntomas de dolor, sin embargo, estos tienen efectos secundarios que pueden resultar dañinos para la salud, por lo tanto, es necesario buscar alternativas que cumplan con el objetivo de reducir las sensaciones de dolor, teniendo como alternativas las plantas medicinales que en sinergia con medicamentos, puedan ayudar a obtener los mismos resultados analgésicos, reduciendo su daño al organismo. Alternativas al diclofenaco, el cual es un analgésico de venta libre, clasificado como medicamento antiinflamatorio no esteroide (AINE)^[10], indicado por vía oral e intramuscular para el tratamiento de síntomas de dolor leve moderado, la fiebre, los cuadros de inflamación en pacientes mayores de 14 años^[2] y además, es uno de los más efectivos para el alivio de los dolores musculoesqueléticos^[6], existe *Momordica charantia*, conocida como melón amargo, es una planta que tiene características medicinales, específicamente en las semillas, teniendo propiedades hipoglucémicas, antivirales, antitumorales y antioxidantes^[8]. Respecto al mecanismo de acción del fármaco, algunos autores indican que *Momordica charantia* incrementa el número de células beta en el páncreas, mientras que otros han demostrado una actividad semejante a la insulina o de incremento de su liberación. Por tanto, la acción hipoglucémica podría producirse por mecanismos pancreáticos y extrapancreáticos, con aumento de la recaptación de glucosa por los tejidos y de la síntesis de glucógeno en el hígado y músculos.^[7]

Se comparan diferentes extractos de plantas medicinales con el objetivo de comparar su eficacia con el control de formalina, esta prueba es un ensayo para la nocicepción^[9], el cual se aplica una solución de formalina al 3% en la pata del roedor^[5].

Materiales y Métodos

Reactivos

Extracto acuoso de *Momordica charantia* (donación por el Dr. Othoniel Hugo Aragón Martínez de la UASLP), diclofenaco y formalina adquirida de Sigma Aldrich.

Animales y normas éticas

El Comité de Ética Institucional aprobó todos los procedimientos y protocolos con animales realizados en la División de Ciencias Naturales y Exactas, los experimentos se realizaron de acuerdo con lo establecido en la NOM 062-ZOO1999 (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). Se utilizaron ratones de cepa BALB/c de 4-6 semanas de edad con un peso de 25-30 gramos del bioterio de la Universidad de Guanajuato, los animales se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas con alimento y agua adecuado.

Evaluación de la actividad antinociceptiva

La prueba de formalina se basa en la administración de un estímulo (formaldehído diluido) de dolor en la zona administrada como lo es formalina al 3% el cual va a promover la presencia de una sensación de dolor continuo y similar a un dolor clínico.^[3]

Antes de la prueba, los ratones se dividieron en grupos según la dosis experimental a probar de extracto, diclofenaco o extracto/diclofenaco, se colocaron individualmente en cilindros de acrílico durante 30 minutos por 3 días seguidos como periodo de adaptación.

Una hora previa a la administración de formalina, a cuatro grupos experimentales se les administró de forma oral el extracto acuoso de *M. charantia* en dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/kg. El diclofenaco con las siguientes dosis: 12.5, 25, 50 y 100 mg/kg, fue administrado vía oral a otros cuatro grupos. A los últimos cuatro grupos se les administró de manera oral una combinación del extracto etanólico de *M. charantia* con diclofenaco con dosis de 5.9, 11.8, 23.6 y 47.1 mg/kg.

Para realizar la prueba de formalina, se inyectó subcutáneamente formalina al 3% en la superficie dorsal de la pata trasera derecha. Inmediatamente después de la inyección cada ratón se colocó en un cilindro de acrílico colocando un espejo por detrás del cilindro para tener una vista completa de todos los ángulos del ratón y su pata inyectada con formalina. La inyección de formalina resultó en una necesidad de lamidas de pata por parte de los ratones. El comportamiento del dolor y evaluación del efecto antinociceptivo fue monitoreado por un período de 45 minutos; el tiempo de lamidas de la pata inyectada se cuantificó en intervalos de 5 minutos comenzando en el tiempo 0. Se observó que la formalina produce una respuesta dolorosa en dos fases, en donde la fase I de corta duración debido a la activación de las fibras C comenzó inmediatamente después de la administración de formalina hasta 10 min después y la fase II dependiente de la reacción inflamatoria y cambios funciones en médula espinal inició a los 10 minutos y terminó hasta los 45 minutos del experimento.^[1]

Análisis de datos

Mediante la regresión lineal, utilizando el programa NCSS, se determinó el valor de la Dosis Efectiva 50 (DE₅₀). Una prueba de ANOVA y Dunnett fueron empleados para el análisis estadístico y los datos se presentan como el promedio ± error estándar de la media (EEM), considerando valores estadísticamente significativos de p<0.05.

Para estimar el efecto analgésico se calculó el % de antinocicepción por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ antinocicepción} = \frac{T. \text{ de lamida sin fármaco} - T. \text{ de lamida con fármaco}}{T. \text{ de lamida sin fármaco}} \times 100$$

Los resultados del estudio de la combinación del extracto con el diclofenaco fueron evaluados mediante un análisis isoblográfico.

Resultados y Discusión

Con la finalidad de determinar el tipo de interacción farmacológica entre el extracto etanólico de *Momordica charantia* y el diclofenaco, uno de los AINEs más utilizados dentro de la farmacoterapia del dolor, se evaluó el efecto antinociceptivo primeramente del extracto de *Momordica charantia* y del diclofenaco por separado, para posteriormente evaluar el efecto de la combinación, empleando el modelo de la formalina en ratones.

Evaluación del efecto antinociceptivo

Tanto la administración individual de diclofenaco, así como del extracto de *M. charantia* y las combinaciones de ambos; como pretratamientos por vía oral 60 minutos antes del agente nociceptivo (formalina), ocasionó una disminución de la conducta bifásica de lamida/mordisqueo de la extremidad dañada del ratón.

Primeramente, el efecto antinociceptivo tanto del extracto de *M. charantia* como del diclofenaco se evaluó empleando cuatro dosis diferentes, en qué se puede observar el perfil típico del modelo, el cual comienza con un aumento nociceptivo en los primeros cinco minutos de evaluación, reflejado en el aumento de tiempo de lamida (fase I); seguido de una disminución del dolor (efecto antinociceptivo) en las concentraciones empleadas (fase II), se puede apreciar que tanto el extracto como el fármaco disminuyen de manera dosis dependiente la conducta nociceptiva.

Debido a la naturaleza del modelo empleado, los AINEs como el diclofenaco tiene efectos limitados en la primera fase de esta prueba, solo considerando el efecto tanto del extracto como del fármaco en la segunda fase para efectuar el análisis y determinar así los valores de la dosis efectiva 50 (DE₅₀). El método empleado para calcular la DE₅₀ del extracto de *M. charantia* así como del diclofenaco administrados individualmente indica que únicamente se deben utilizar los datos de % de efecto en función del logaritmo de las dosis que mejor se ajusten a una ecuación de una línea recta. En este sentido, para este caso se emplearon los datos de todas las dosis utilizadas, Así pues, al evaluar las curvas dosis-efecto del fármaco (Figura 1) y del extracto (Figura 2) se lograron estimar las DE₅₀, obteniendo un valor de 65.61 mg/kg para el extracto de *M. charantia* y de 28.66 mg/kg para el diclofenaco.

Tabla 1 .Efectos de la dosis del extracto de *Momordica charantia*

Dosis (mk/kg)	Efecto antinociceptivo
---------------	------------------------

25	24.38
50	41.72
100	57.08
200	85.38

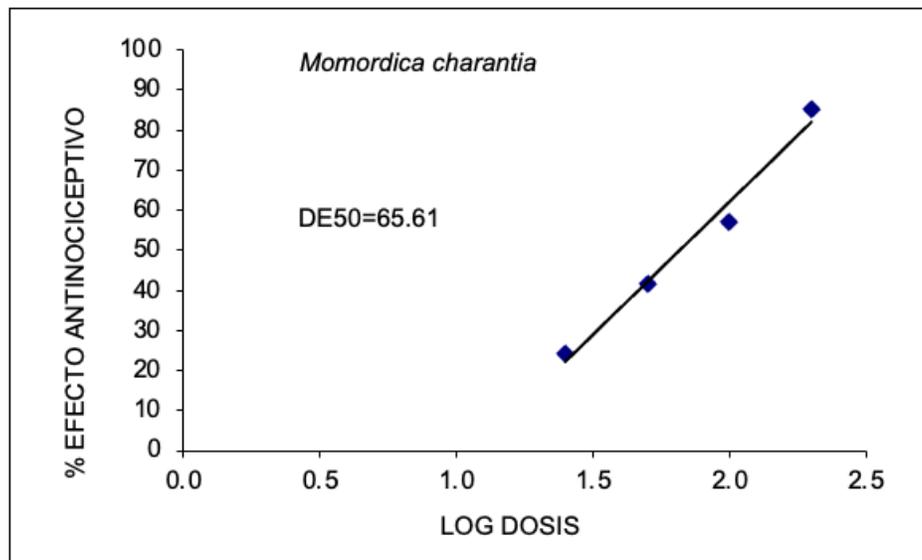


Figura 1. Curva Dosis-efecto en la fase II del extracto de *M. Charantia* en el modelo de formalina aplicada en ratones.

Tabla 2. Efecto antinociceptivo del Diclofenaco

Dosis (mk/kg)	Efecto antinociceptivo
12.5	27.29618
25	43.55005
50	67.95666
100	85.19092

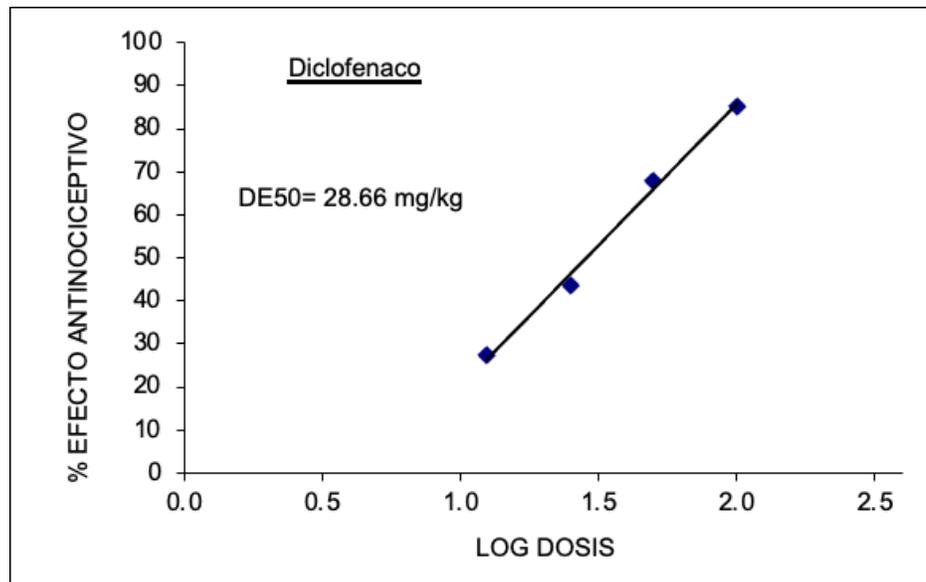


Figura 2. Curva Dosis-efecto en la fase II del diclofenaco en el modelo de formalina aplicada en ratones.

Interacción analgésica y análisis isoblográfico

A continuación, se llevó a cabo la evaluación antinociceptiva de la combinación entre el diclofenaco y el extracto de *M. charantia* a través de la administración de cuatro dosis preparadas con diferentes proporciones de ambas sustancias (tabla 3). Para llegar a estos valores fue necesario calcular primero la DE_{50} teórica de la combinación tomando como referencia los valores la dosis efectiva 50 calculada de forma independiente tanto para el tratamiento farmacológico (diclofenaco) como el extracto, el valor obtenido en este caso fue de 47.1 mg/kg. Las dosis de la combinación se prepararon manteniendo las proporciones antes mencionadas, tomando como la dosis más alta de prueba el valor estimado para la DE_{50} teórica.

Tabla 3. Diluciones en proporciones fijas de la combinación de diclofenaco y extracto de *M. charantia* preparadas a partir de los valores individuales de las DE_{50} .

Proporción en la combinación	Diclofenaco (mg/kg)	Extracto de <i>M. charantia</i> (mg/kg)	Dosis total combinación (mg/kg)
DE_{50} (DIC) + DE_{50} (EXT)/2	14.3	32.8	47.1
DE_{50} (DIC) + DE_{50} (EXT)/4	7.2	16.4	23.6
DE_{50} (DIC) + DE_{50} (EXT)/8	3.6	8.2	11.8
DE_{50} (DIC) + DE_{50} (EXT)/16	1.8	4.1	5.9

DIC =Diclofenaco; EXT=Extracto de *Momordica charantia*

En la figura 3, la curva dosis-efecto en la fase II corroboró que el efecto antinociceptivo es dosis-dependiente en el ensayo con la combinación. Con estos resultados, se calculó la DE_{50} experimental que resultó en un valor de 21.75 mg/kg.

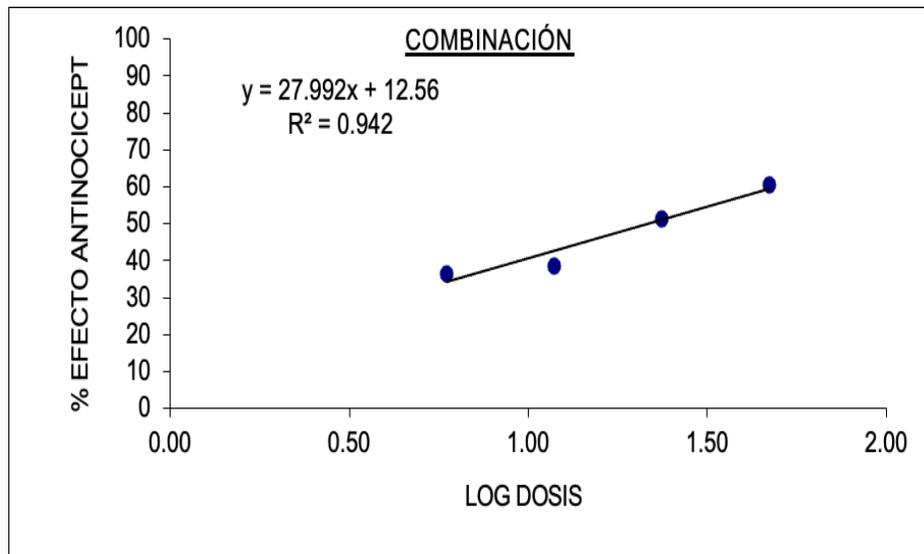


Figura 3. Curva Dosis-efecto en la fase II de la combinación del extracto de *M. Charantia* y diclofenaco en el modelo de formalina aplicada en ratones.

Una vez conocidos los valores de la DE₅₀ teórica y experimental, se realizó un análisis isoblográfico para determinar la posible interacción entre los componentes de la combinación analizada. El gráfico se presenta en la figura 4 y en él se puede observar el punto T que corresponde a la DE₅₀ teórica de la combinación, la línea recta que une las DE₅₀ del diclofenaco y el extracto indica las posibles combinaciones entre ambas sustancias y que producen un efecto sumatorio. Por su parte, el punto E corresponde a la DE₅₀ experimental y que, al estar por debajo de la línea recta, nos está indicando que esta presenta una interacción de potenciación (sinergismo) entre el diclofenaco y el extracto de *Momordica charantia*.

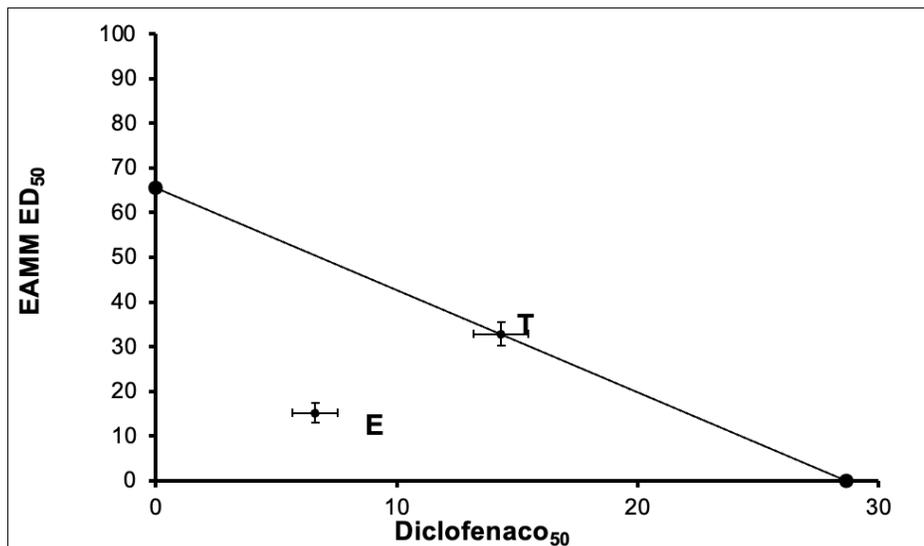


Figura 4. Isoblograma de la interacción entre el extracto acuoso de *M. Charantia* y diclofenaco en el efecto antinociceptivo en el modelo de formalina aplicada en ratones.

Conclusiones

El extracto acuoso de *M. charantia* mostró tener una actividad antinociceptiva en las cuatro dosis evaluadas en la segunda fase del modelo de la formalina en ratones, con una DE₅₀ de 65.61 mg/kg. Además, la administración oral de la combinación entre uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento del dolor diclofenaco y el extracto de *M. charantia* ocasiona una interacción de potenciación (sinergismo) en el efecto antinociceptivo en el modelo empleado. Estos resultados indican que una posible incorporación del extracto o metabolitos específicos y propios del mismo a formulaciones en combinación con fármacos como los AINEs puede resultar en una estrategia terapéutica mucho más efectiva para el tratamiento del dolor agudo, moderado a severo, resultando necesario la elaboración de más ensayos, como el realizado que reafirmen la evidencia experimental encontrada en este estudio.

Referencias

1. Arne Tjølsen, Odd-Geir Berge, Steinar Hunskaar, Jan Henrik Rosland, Kjell Hole, (1992) The formalin test: an evaluation of the method, *Pain*, Volume 51, Issue 1, Pages 5-17, ISSN 0304-3959, [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-T](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-T)
2. Diclofenaco. (2010). Recuperado el 17 de junio de 2024, de <https://www.stjude.org/es/cuidado-tratamiento/educacion-del-paciente/diclofenaco.html>
3. Dubuisson, D., & Dennis, S. G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(2), 161–174. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0)
4. Fuentes, J. V. (2020). Versión actualizada de la definición de dolor de la IASP: un paso adelante o un paso atrás. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*. <https://doi.org/10.20986/resed.2020.3839/2020>
5. Hunskaar, S., & Hole, K. (1987). The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30(1), 103–114. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1)
6. Juan del Arcoa. (2015). Curso básico sobre dolor. Tema 1. Fisiopatología, clasificación y tratamiento farmacológico. Vol. 29. Núm. 1. Páginas 36-43. Director Técnico del COF de Bizkaia. <https://es.slideshare.net/slideshow/curso-basico-sobre-la-fisiologia-del-dolor/267127620>
7. M Tránsito López Luengoa. (2006). Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante. Vol. 25. Núm 5. Páginas 82-88 <https://es.slideshare.net/etnobotania/plantas-medicinales-hipoglucemiantes>
8. *Momordica charantia*—Ficha informativa. (2017). Recuperado el 17 de junio de 2024, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/cucurbitaceae/momordica-charantia/fichas/ficha.htm#6.%20Impacto%20e%20importancia>
9. Pilar Santacruz, María Del, Oyuela-Vargas, Raúl, Briñez-Orta, José Arturo, Echeverry, Sandra Lucía, & Lareo, Leonardo. (2008). Efectos sobre la actividad nociceptiva de la rata de un péptido nootrópico sintético. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 40(1), 97-109. Recuperado el 18 de junio de 2024, de http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-05342008000100008&lng=pt&tlng=es.
10. Zapata Morales J.R., Alonso Castro A.J., Ruiz Padilla A.J., Cesar Rogelio Solorio Alvarado C.R. y Ramírez Morales M.A.M. (2021) Plantas Medicinales en el tratamiento del Dolor y su interacción con Analgésicos. *Naturaleza y Tecnología Edición especial, dedicado a Farmacia*. ISSN 2007-672X. Universidad de Guanajuato. Recuperado el 18 de junio de 2024 https://www.google.com.mx/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=http://www.naturalezatecnologia.com/index.php/nyt/article/download/395/ramon&ved=2ahUKEwjQyL34_8yHAXXYL0QIHYYiqEAUQFnoECBwQAQ&usg=AOvVaw17kJchd16qV_xeLYujVCS3