

## Evaluación de la actividad antinociceptiva de *Leucaena leucocephala* y la interacción antinociceptiva con Diclofenaco

Angeles Torres José Guillermo<sup>1</sup>, Magno Paleo Cecilia Patricia<sup>2</sup>, Martínez Espinosa María Guadalupe<sup>3</sup>, Perales Rocha Ángel Ernesto<sup>4</sup>, Rosas Arroyo Ángel<sup>5</sup>, Rosiles Aguilera Mariana<sup>6</sup>, Villanueva López Marco Polo<sup>7</sup>, Zapata Morales Juan Ramón<sup>8</sup>

<sup>1,2,4,5,6,7</sup> Lic. Químico Farmacéutico Biólogo y <sup>3</sup>Lic. Biología Experimental, Universidad de Guanajuato

<sup>8</sup>Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato

tg.angelestorres@ugto.mx<sup>1</sup>

cp.magnopaleo@ugto.mx<sup>2</sup>

mg.martinezepinosa@ugto.mx<sup>3</sup>

ae.peralesrocha@ugto.mx<sup>4</sup>

a.rosasarroyo@ugto.mx<sup>5</sup>

m.rosilesaguilera@ugto.mx<sup>6</sup>

mp.villanuevalopez@ugto.mx<sup>7</sup>

juan.zapata@ugto.mx<sup>8</sup>

### Resumen

Actualmente, el alivio al dolor es lo que más se busca en agentes farmacológicos, sin embargo, el tratamiento que suele usarse son los AINES, este tratamiento presenta efectos adversos conocidos como lo son los daños gastrointestinales, nefrotoxicidad y riesgo de abuso. Por lo que un analgésico seguro y efectivo es de suma importancia en la investigación actual. Es por ello que nos basamos en el uso de un extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* como agente analgésico, cuyo efecto antinociceptivo se evaluó con la prueba de formalina en ratones, junto con el uso de diclofenaco a diferentes dosis para evaluar una posible interacción. El efecto antinociceptivo se evaluó durante las fases I y II de la prueba en diferentes grupos de ratones, donde el extracto de *Leucaena leucocephala* supera el 30% de efecto en las dosis evaluadas, al igual que la combinación del extracto con el diclofenaco en la fase I de este modelo. De la misma manera que el % de antinocicepción es dosis dependiente tanto en el extracto de *Leucaena leucocephala* como en la combinación en la fase II. Finalmente se obtuvo una DE50 para *Leucaena leucocephala* de 19.32 mg/kg. La administración oral de la combinación entre diclofenaco y el extracto de *Leucaena leucocephala* ocasiona una interacción de potenciación (sinergismo) en el efecto antinociceptivo en el modelo empleado por lo que 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.

**Palabras clave:** dolor, AINES, *Leucaena leucocephala*, diclofenaco, dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>), efecto antinociceptivo, fase I, fase II, isoblograma.

### Abstract

Currently, pain relief is what is most sought in pharmacological agents, however the treatment that is usually used are NSAIDs, they present known adverse effects such as gastrointestinal damage, nephrotoxicity and risk of abuse. Therefore, a safe and effective pain reliever is of the utmost importance in current research. That is why we based ourselves on the use of an aqueous extract of *Leucaena leucocephala* as an analgesic agent, whose antinociceptive effect was evaluated with the formalin test in mice, together with the use of diclofenac at different doses to evaluate a possible interaction. The antinociceptive effect was evaluated during phases I and II of the test in different groups of mice, where the *Leucaena leucocephala* extract exceeds 30% antinociceptive at the evaluated doses, in the same way as in combination in phase I. While the % antinociceptivity is dose-dependent in both the *Leucaena leucocephala* extract and combination in phase II. Finally, an DE50 for *Leucaena leucocephala* of 19.32 mg/kg was obtained. Oral administration of the combination between diclofenac and the extract of *Leucaena leucocephala* causes a potentiation interaction (synergism) in the antinociceptive effect in the model used, so it may result in a much more effective therapeutic strategy for the treatment of acute, moderate to severe pain, making it necessary to carry out more trials.

**Keywords:** pain, NSAIDs *Leucaena leucocephala*, naproxen, effective dose 50 (ED<sub>50</sub>), antinociceptive effect, phase I, phase II, isobologram.

### Introducción

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, el dolor se define como una experiencia sensorial aversiva causada por una lesión real o potencial, la cual produce reacciones motoras y vegetativas progresivas que desencadena con comportamiento aprendido de evitación y puede modificar comportamientos específicos de la especie.<sup>[1]</sup> El conocimiento de la etiología y la identificación del mecanismo de producción del dolor son necesarios para planificar el tratamiento. Desde esta definición se entienden los modelos animales del dolor como un medio imprescindible para su estudio donde se valora la especie animal y la dimensión somática de la respuesta nociceptiva a un estímulo nocivo.<sup>[2]</sup> El

tipo de dolor agudo más frecuente es el nociceptivo, el cual puede ser aliviado con facilidad por los AINEs (Antiinflamatorios no esteroideos) cuando este dolor es leve o moderado. El modelo de dolor que se llevó a cabo fue la “Prueba del formol” diseñado por Dubuisson y Dennis en 1977.<sup>[3]</sup>

Los AINEs son fármacos con estructura química heterogénea que comparten actividad antipirética, antiinflamatoria y analgésica a través de su capacidad para inhibir las actividades de la cox-1 presente en diversos tejidos y que media reacciones fisiológicas y la cox-2 que está presente en el tejido lesionado.<sup>[4]</sup> Los AINEs son utilizados en diferentes situaciones clínicas, de forma que, en dosis únicas y pautas cortas, son analgésicos efectivos para el tratamiento del dolor de leve a moderado de origen somático, musculoesquelético, posoperatorio, visceral y óseo metastásico.<sup>[5]</sup> Los AINEs tradicionales o más comunes involucran a la aspirina, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y muchos otros medicamentos, tanto genéricos como de patente.

Mientras tanto en la medicina se ha investigado a fondo sobre la *Leucaena leucocephala* donde se ha reportado que las propiedades de las hojas han reducido los efectos en el dolor debido a que contiene flavonoides activos; algunos investigadores han concretado más a fondo que las hojas de *Leucaena leucocephala*, indican que contienen metabolitos secundarios en forma de alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos. Por otro lado, la semilla ha demostrado propiedades antihelmínticas, insomnio, hinchazón, inflamación renal y diabetes.<sup>[6]</sup> Los flavonoides han demostrado sus propiedades analgésicas inhibiendo la acción de la enzima ciclooxigenasa. Causando la reducción de prostaglandinas por el ácido araquidónico dando como resultado la reducción del dolor.<sup>[7]</sup>

Las combinaciones de diferentes AINEs con herbolaria medicinal pueden resultar en modificaciones del sistema ADME (Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción) de cada fármaco, ya sea favoreciendo o dificultando uno o varios de sus procesos. La investigación de estas interacciones ayuda a la predicción de efectos secundarios de los fármacos y al aumento de efectividad de ciertas formulaciones farmacológicas, por lo cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antinociceptivo de *Leucaena leucocephala* y la interacción antinociceptiva con Diclofenaco

#### *Materiales y métodos*

#### Reactivos

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

#### Animales

Se utilizaron ratones de cepa BALB/c de 8-10 semanas de edad con un peso de 35-45 gramos que fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad de Guanajuato, los ratones se mantuvieron con un ambiente controlado a ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas con con alimento, agua y temperatura adecuada.

De acuerdo con los procedimientos y protocolos con animales en la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato y la NOM 062-ZOO1999 que especifica las técnicas para la producción, el cuidado y el uso de los animales de laboratorio. Cada uno de los procedimientos fueron realizados con las recomendaciones de la Asociación Internacional para el Estudios del Dolor.

#### Evaluación de la actividad antinociceptiva

El procedimiento se llevó a cabo por mediante la prueba de formalina la cual consiste en administrar formaldehído diluido como estímulo de dolor (formalina al 3%), los ratones fueron ambientados 30 minutos por 3 días antes de la prueba en cilindros de acrílico transparente, cada grupo de una jaula diferente.

Una hora previa a la administración de formalina, a cuatro grupos experimentales se les administró de forma oral el extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* con dosis de; 10, 25, 50 y 100 mg/kg. A otros cuatro grupos experimentales, se les administró de manera oral diclofenaco a dosis de 10, 25, 50 y 100 mg/kg, y a cuatro grupos experimentales se les administró la combinación de la DE<sub>50</sub> del extracto de *Leucaena leucocephala* con la DE<sub>50</sub> de diclofenaco.

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 en respuesta al dolor generado. 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.<sup>[7]</sup>

## Análisis de datos

Utilizando el programa de NCSS se determinó el valor de la Dosis efectiva (DE50). Por medio de regresión lineal, la prueba de Dunnett y el ANOVA fueron empleados para los resultados estadísticos. Se obtuvieron datos como el promedio  $\pm$  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 isobolográfico.

### *Resultados y discusión*

Con el propósito de determinar el tipo de interacción farmacológica entre el extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* y el diclofenaco, se evaluó el efecto antinociceptivo de manera individual, primero del extracto de *Leucaena leucocephala* y diclofenaco, una vez calculada la DE<sub>50</sub> de manera individual, se evaluó este efecto antinociceptivo de la combinación del extracto de *Leucaena leucocephala* con diclofenaco, empleando el modelo de la formalina en ratones.

## Evaluación del efecto antinociceptivo

Tanto la administración individual del extracto de *Leucaena leucocephala* como el diclofenaco y las combinaciones de ambos; fueron administrados por vía oral 60 minutos antes del agente nociceptivo (formalina), los 3 tratamientos, ocasionaron una disminución de la conducta bifásica de lamida/mordisqueo de la extremidad dañada del ratón.

Primeramente, el efecto antinociceptivo del extracto de *Leucaena leucocephala* se evaluó empleando cuatro dosis diferentes, en las figura 1 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 el extracto disminuye de manera dosis dependiente la conducta nociceptiva.

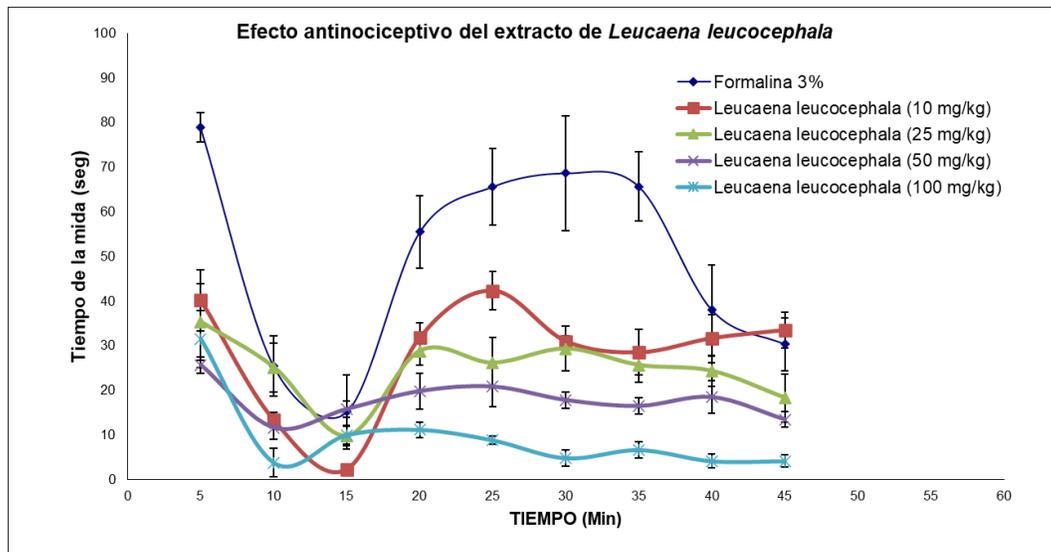


Figura 1. Curso temporal de la conducta nociceptiva del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* en el modelo de formalina.

Tomando los resultados del tiempo de lamida en el modelo empleado, se calculó el porcentaje de antinocicepción para cada dosis en las fases I y II de manera independiente. Para el extracto, en la fase I (Figura 2), correspondiente a la activación de los nociceptores de la pata, las cuatro dosis empleadas del extracto de *Leucaena leucocephala* mostraron un efecto antinociceptivo mayor al 30%, en la fase II (Figura 3) se puede observar que el efecto antinociceptivo aumenta en comparación a la fase I, a excepción de la dosis de 10 mg/kg la cual no muestra un aumento de este efecto antinociceptivo, aunque el porcentaje de este efecto sigue siendo mayor al 30%.

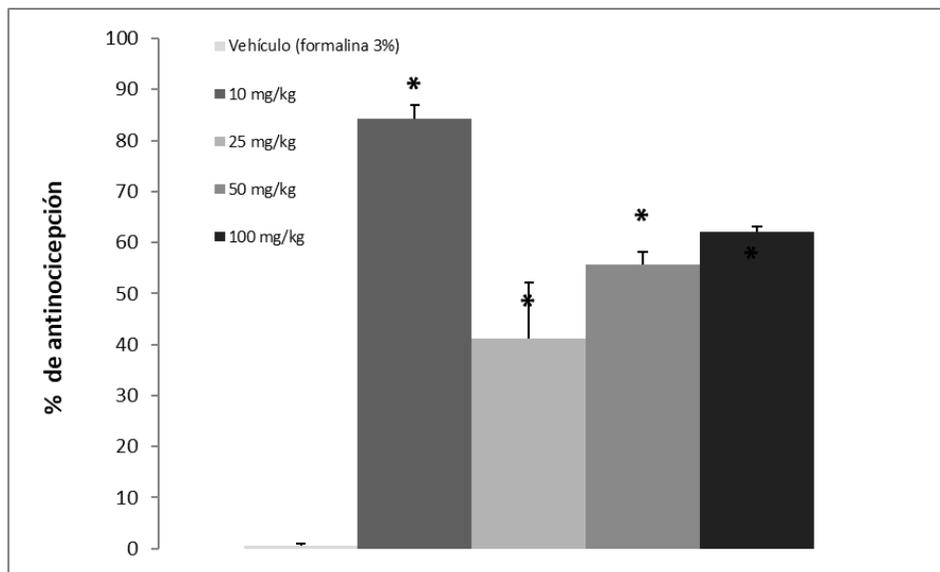


Figura 2. Porcentaje de antinocicepción en la fase I del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* en el modelo de formalina. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM (\* $p < 0.05$  vs vehículo; prueba de Dunnett).

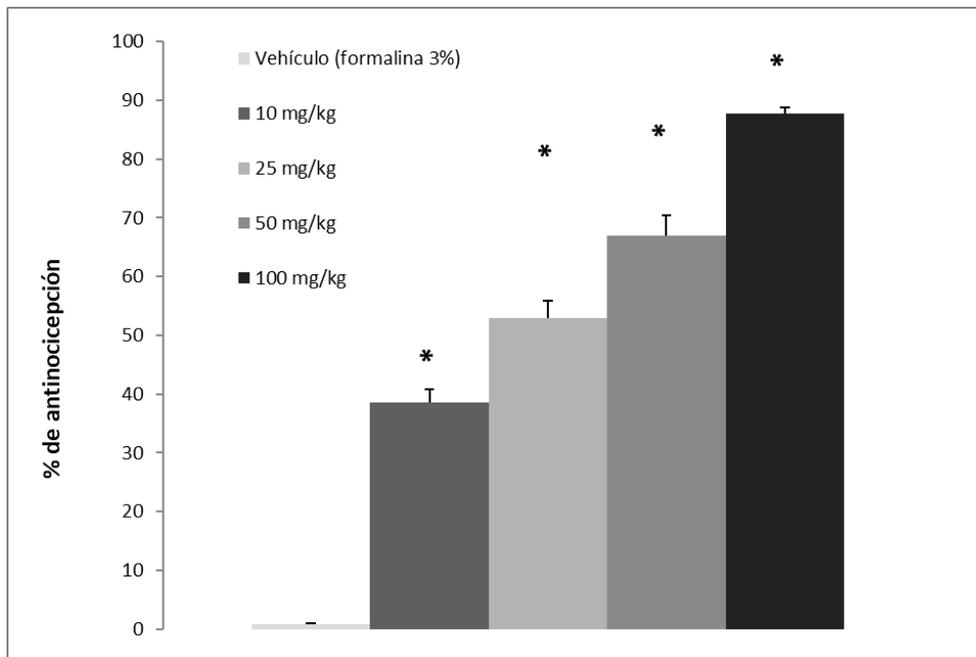


Figura 3. Porcentaje de antinocicepción en la fase II del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* en el modelo de formalina. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM (\* $p < 0.05$  vs vehículo; prueba de Dunnett).

Como se muestra en el gráfico, en la fase II de dolor inflamatorio (fase de interés para este estudio) las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg del extracto (figura 3) mostraron disminución del dolor, esto nos indica que el porcentaje de antinocicepción tuvo un comportamiento dosis dependiente.

Debido a la naturaleza del modelo empleado y a que como se sabe, los AINEs como el diclofenaco tienen efectos máximos en la segunda fase de esta prueba, solo se consideró 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 (DE<sub>50</sub>). El método empleado para calcular la DE<sub>50</sub> del extracto de *Leucaena leucocephala* 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 extracto (figura 4) y del fármaco (figura 5) se lograron estimar las DE<sub>50</sub>, obteniendo un valor de 19.32 mg/kg para el extracto de *Leucaena leucocephala* y de 23.54 mg/kg para el diclofenaco.

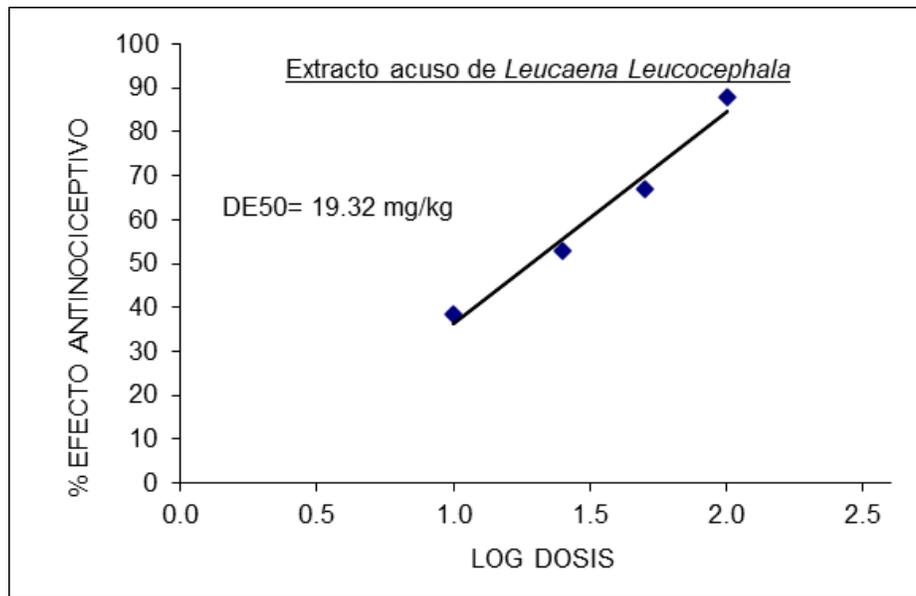


Figura 4. Curva dosis-efecto en la fase II del extracto de *Leucaena leucocephala* en el modelo de formalina aplicado en ratones.

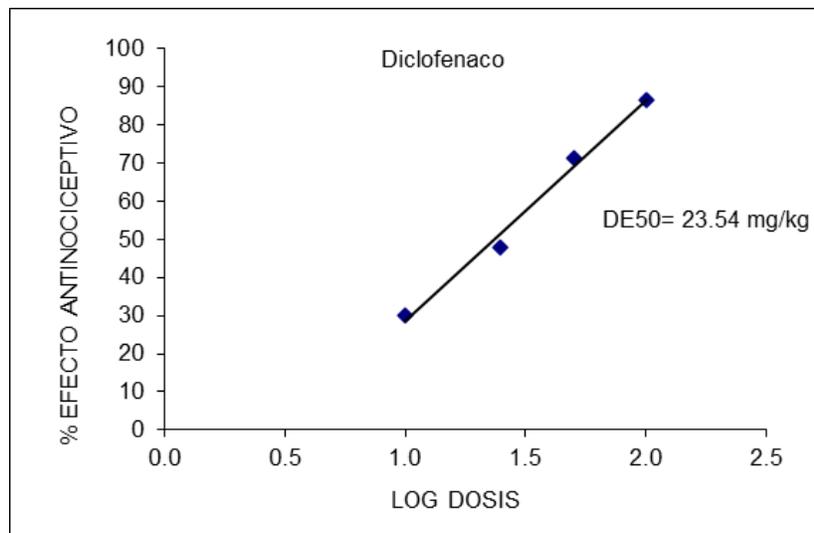


Figura 5. Curva dosis-efecto en la fase II del diclofenaco en el modelo de formalina aplicado en ratones.

### Interacción analgésica y análisis isoblográfico

Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación antinociceptiva de la combinación entre el diclofenaco y el extracto de *Leucaena leucocephala* a través de la administración de cuatro dosis preparadas con diferentes proporciones de ambas sustancias (tabla 1). Para llegar a estos valores se tuvo que calcular primero la  $DE_{50}$  teórica de la combinación tomando como referencia los valores la dosis efectiva 50 calculada de forma independiente de diclofenaco y el extracto de *Leucaena leucocephala*, el valor obtenido fue de 21.43 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 1.** Diluciones en proporciones fijas de la combinación de diclofenaco y *Leucaena leucocephala* preparadas a partir de los valores individuales de las  $DE_{50}$ .

Proporción en la combinación	Diclofenaco (mg/kg)	Extracto de LL (mg/kg)	Dosis total combinación (mg/kg)
DE <sub>50</sub> (DICLO) + DE <sub>50</sub> (LL)/1	19.3	23.5	42.9
DE <sub>50</sub> (DICLO) + DE <sub>50</sub> (LL)/2	9.7	11.8	21.4
DE <sub>50</sub> (DICLO) + DE <sub>50</sub> (LL)/4	4.8	5.9	10.7
DE <sub>50</sub> (DICLO) + DE <sub>50</sub> (LL)/8	2.4	2.9	5.4
DE <sub>50</sub> (DICLO) +DE <sub>50</sub> (LL)/16	1.2	1.5	2.7

DICLO= Diclofenaco; LL=Extracto de *Leucaena leucocephala*

La figura 6 muestra el comportamiento de las combinaciones evaluadas de la combinación con respecto a la disminución del dolor, se observa que efectivamente existe una acción antinociceptiva en las cuatro dosis evaluadas.

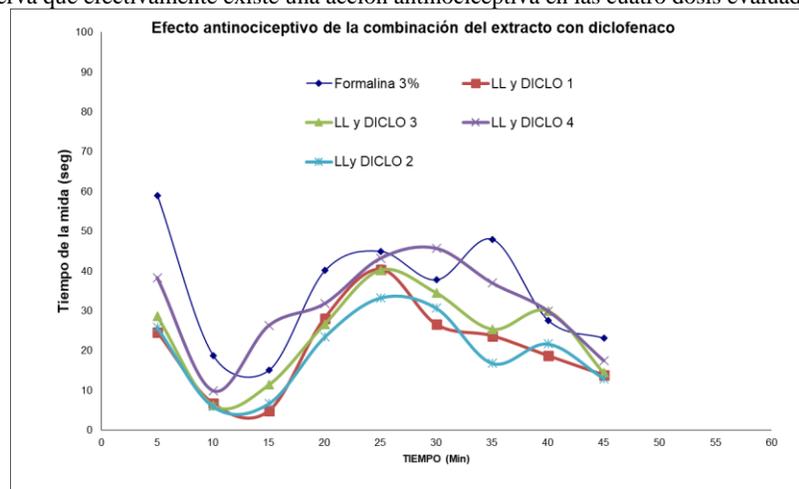


Figura 6. Curso temporal de la conducta nociceptiva de la combinación del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* y diclofenaco en el modelo de formalina.

Los gráficos de porcentaje de efecto antinociceptivo de las combinaciones en ambas fases muestran una clara disminución del dolor; en la fase I (figura 7) las cuatro concentraciones de la combinación mostraron valores mayores al 50%. Por su parte, en la fase II el porcentaje de antinocicepción disminuyó ligeramente, esto, como se mencionó anteriormente, el diclofenaco tiene efectos máximos en la fase II en el modelo de formalina, presentándose los valores de efecto antinociceptivo de 36.6, 46.6, 47.71 y 53.06% (figura 8).

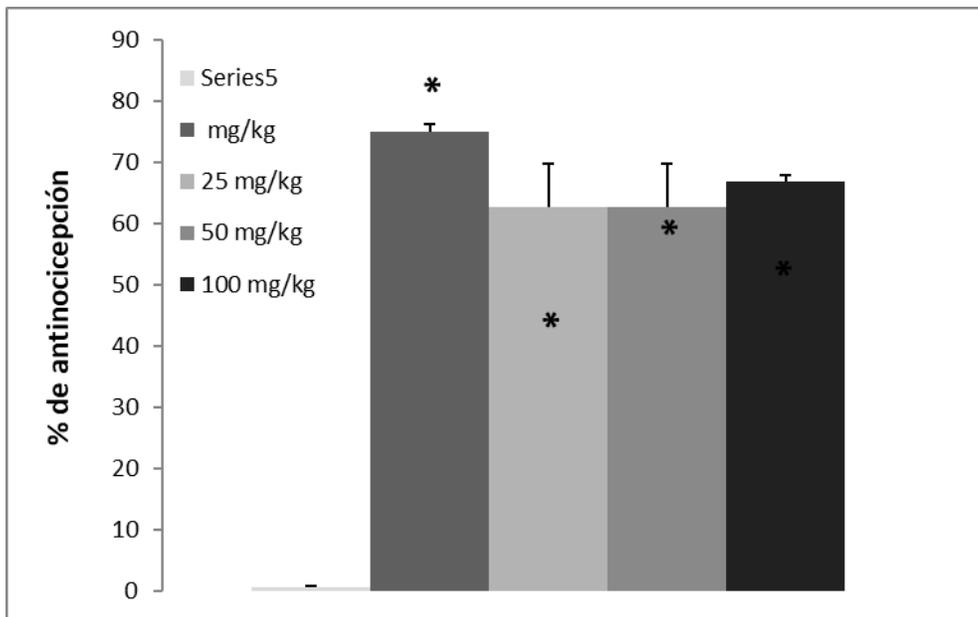


Figura 7. Porcentaje de antinocicepción en la fase I de la combinación del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* y diclofenaco en el modelo de formalina. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM (\* $p < 0.05$  vs vehículo; prueba de Dunnett).

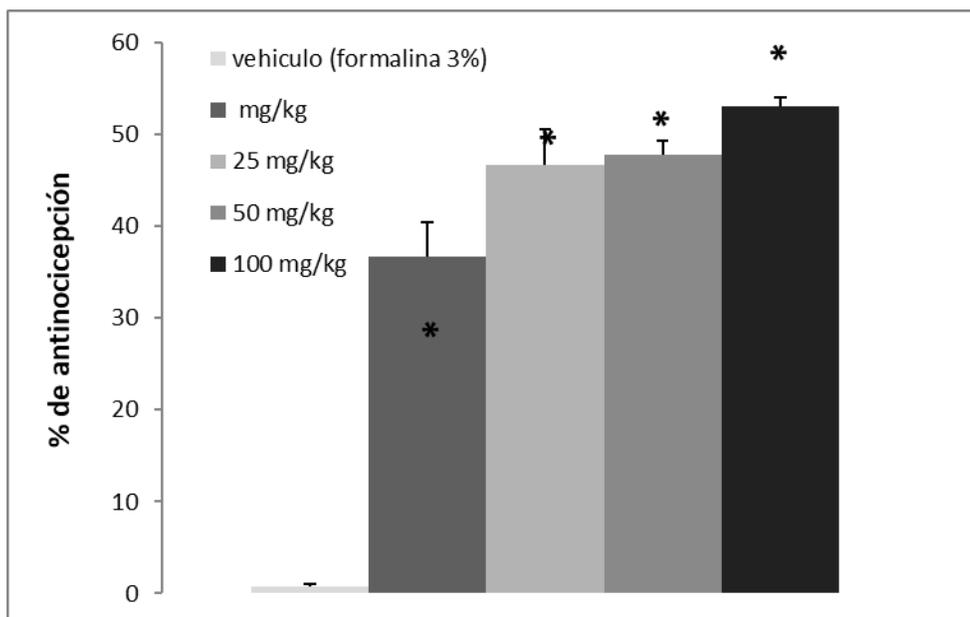


Figura 8. Porcentaje de antinocicepción en la fase II de la combinación del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* en el modelo de formalina. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM (\* $p < 0.05$  vs vehículo; prueba de Dunnett).

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 13.91 mg/kg (figura 12).

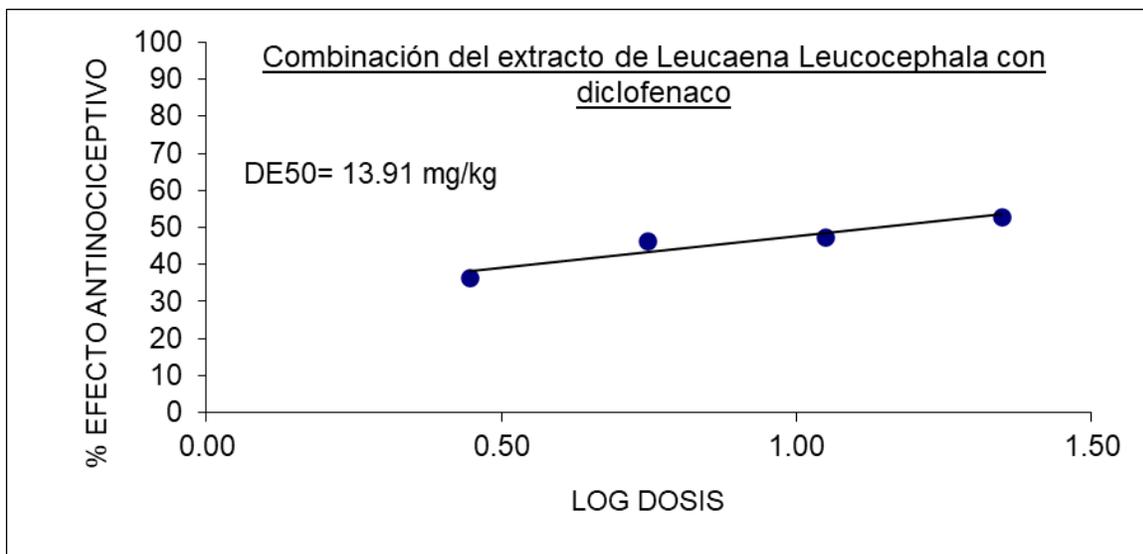


Figura 9. Curva dosis-efecto en la fase II de la combinación del extracto de *Leucaena leucocephala* y diclofenaco en el modelo de formalina aplicado en ratones.

Una vez conocidos los valores de la DE<sub>50</sub> 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 10 y en él se puede observar el punto T que corresponde a la DE<sub>50</sub> teórica de la combinación, la línea recta que une las DE<sub>50</sub> 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 DE<sub>50</sub> experimental y que, al estar por debajo de la línea recta (diagonal), nos está indicando que esta presenta una interacción de potenciación (sinergismo) entre el diclofenaco y el extracto de *Leucaena leucocephala*.

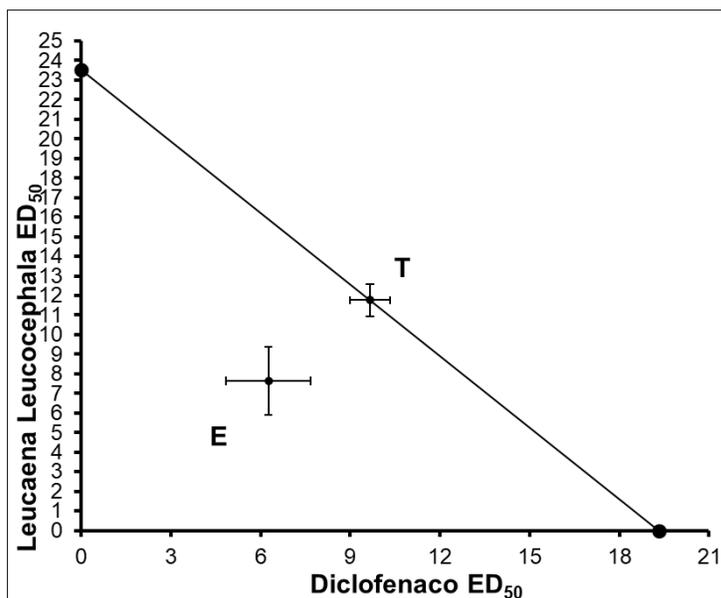


Figura 10. Isoblograma de la interacción entre el extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* y diclofenaco en el efecto antinociceptivo en el modelo de formalina.

#### Conclusión

El extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* mostró tener una actividad antinociceptiva mayor que la fase uno en tres de las cuatro dosis evaluadas en la segunda fase del modelo de la formalina en ratones, con una DE<sub>50</sub> de 19.32 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 *Leucaena leucocephala* ocasiona una interacción de potenciación (sinergismo) en el efecto antinociceptivo en el modelo empleado. Estos resultados nos indican que una posible incorporación del extracto o metabolitos específicos y propios del mismo a formulaciones en combinación con fármacos como los AINEs que pueden 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.

#### *Bibliografía/Referencias*

- [1] Pérez Fuentes, J. (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*, 27 (4), 232-233. Epub 13 de octubre de 2020. <https://dx.doi.org/10.20986/resed.2020.3839/2020>
- [2] Garrido, B., Bosch, F., Garrido, G., Hernández-Balmaseda, I., & Delgado-Hernández, R.. (2007). Modelos animales de dolor y electroacupuntura. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 14(4), 296-306. Recuperado en 14 de julio de 2023, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1134-80462007000400007&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-80462007000400007&lng=es&tlng=es).
- [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] Pérez Ruiz, Andrés A., López Mantecón, Ana Marta, & Grau León, Ileana. (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).: Consideraciones para su uso estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2), 119-138. Recuperado en 14 de julio de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072002000200004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200004&lng=es&tlng=es).
- [5] Aristil, Chéry, Pierre Mitchel. *Manual de farmacología básica y clínica* (6a. ed.), McGraw-Hill Interamericana, 2013. Capítulo 22. ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentralproquest-com.e-revistas.ugto.mx/lib/ugtomhe/detail.action?docID=3214421>.
- [6] Septina, E., Yetti, R. D., & Rivai, H. (2020). Overview of Traditional Use, Phytochemical, and Pharmacological Activities of Chinese Petai (*Leucaena leucocephala*). *Int. J. Pharm. Sci. Med*, 5(12), 1-10.
- [7]. Ishak, M. (2017). Analgesic effect test of ethanol extract of lamtoro leaves (*leucaena leucocephala* (lam) de wit) on male white mice (*mus musculus*). *pharmacon* 6(4).