



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

TESIS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA DE

Aloysia gratissima var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var.

platyphylla EN RATONES

TERESA DEJESUS TABOADA JARA

Tutor: Prof. Dra. María Luisa Kennedy Rolón

San Lorenzo – Paraguay

Agosto – 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA DE

Aloysia gratissima var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var.

platyphylla EN RATONES

Tesis presentada por la Química Farmacéutica Teresa Dejesus Taboada Jara a la Coordinación de Postgrado, para optar por el título de Máster en Ciencias Farmacéuticas

Ciudad Universitaria, San Lorenzo

PARAGUAY

AGOSTO 2021

Taboada Jara, Teresa Dejesus

**Evaluación de la Actividad Antidepresiva de Aloysia Gratissima Var.
Gratissima y Aloysia Virgata Var. Platyphylla en Ratones / Teresa Dejesus
Taboada Jara. - - San Lorenzo: La Autora, 2021.**

56 p.: fig.; 30 cm.

**Tesis presentada a la Coordinación de Postgrado de la Facultad de Ciencias
Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención
del Título de Máster en Ciencias Farmacéuticas.**

1. ANTIDEPRESIVO. 2. PLANTAS MEDICINALES I. Título.

CDD: 580

T114e

Prof. Dr./a. María Luisa Kennedy Rolón, de la Facultad de Ciencias Químicas-
Universidad Nacional de Asunción.

TUTOR/A DE LA PRESENTE TESIS

Autoriza: La presentación del trabajo titulado “Evaluación de la actividad antidepresiva de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en ratones”.

Dado que el mismo reúne la calidad y cantidad de trabajo necesario para constituir la TESIS DE MAESTRÍA que la QF. (Teresa Dejesus Taboada Jara) presenta para aspirar al grado de Máster en Ciencias Farmacéuticas.

San Lorenzo, 20 de agosto de 2021

Prof. Dra. María Luisa Kennedy Rolón

Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Asunción



Aprobado en fecha 20 de agosto de 2021.

Tribunal Examinador:

Prof. Dr. Derlis Ibarrola
Prof. Dra. María Eugenia Flores
Prof. Dra. Cristina Romero
Prof. Dra. Yenny González

FCQ/UNA
FCQ/UNA
FCQ/UNA
FCQ/UNA

AGRADECIMIENTO

A Dios, por brindarme las fortalezas para culminar este proceso.

A mi familia, por el eterno apoyo, en todas las situaciones atravesadas. A Diego, por ser soporte en cada paso de mi vida personal y académica. A mis amigos, por acompañarme en este proceso.

Al departamento de Farmacología, con todos sus miembros que contribuyeron en cada paso de mi formación, me incluyeron en el equipo de trabajo y han colaborado en cada proyecto del cual forme parte. A los profesores María Luisa Kennedy y Miguel Campuzano, por guiarme en este proceso y en otros proyectos más, a los profesores Derlis, María del Carmen, Olga, Yenny, a mis compañeros Wilfrido y Antonia, por la eterna ayuda que han brindado en cada trabajo.

A los compañeros de maestría y amigos, con ellos fue más fácil sobrellevar este proceso.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y docentes, por brindarnos la oportunidad y acompañarnos arduamente en este proceso de formación científica.

Tabla de contenido

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	3
MARCO TEÓRICO	4
Depresión	4
Tratamiento antidepresivo	6
Plantas medicinales para el tratamiento de la depresión.	7
Verbenaceae para el tratamiento de la depresión.	8
Antecedentes químicos y farmacológicos de <i>Aloysia gratissima</i> , <i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i> , <i>Aloysia virgata</i> y <i>Aloysia virgata</i> var. <i>platyphylla</i> .	10
OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Preparación de muestras	15
Animales	15
Reactivos	16
Evaluación de la actividad antidepresiva	16
Ensayo de suspensión de la cola después del tratamiento oral con tres dosis en 24 horas, y tratamiento oral por 7 días	16
Ensayo de natación forzada después del tratamiento oral con tres dosis en 24 horas, y tratamiento oral por 7 días	17
Gestión y análisis de los datos	17
Asuntos éticos	18
RESULTADOS	19

Efecto del tratamiento oral con tres dosis por 24 horas con el extracto de <i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i> en el ensayo de suspensión de la cola	19
Efecto del tratamiento oral por 7 días con extracto de <i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i> en el ensayo de suspensión de la cola.	20
Efecto en los parámetros evaluados en natación forzada luego del tratamiento oral con tres dosis en 24 horas de <i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i>	21
Efecto en los parámetros de natación forzada luego del tratamiento oral por 7 días con <i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i>	24
Efecto del tratamiento oral con tres dosis por 24 horas con el extracto de <i>Aloysia virgata</i> var. <i>platyphylla</i> en el ensayo de suspensión de la cola	27
Efecto del tratamiento oral por 7 días con <i>Aloysia virgata</i> var. <i>platyphylla</i> en el ensayo de suspensión de la cola	28
Efecto en los parámetros de natación forzada luego del tratamiento oral con tres dosis en 24 horas de <i>Aloysia virgata</i> var. <i>platyphylla</i>	29
Efecto en los parámetros de natación forzada luego del tratamiento oral por 7 días con <i>Aloysia virgata</i> var. <i>platyphylla</i>	32
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	48

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA DE *Aloysia gratissima* var. *gratissima* Y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* EN RATONES

Autor: Teresa Dejesus Taboada Jara
Tutor: Prof. Dra. María Luisa Kennedy Rolón

RESUMEN

La depresión es uno de los principales contribuyentes a la carga global de enfermedad, puede tener efectos graves en el funcionamiento social, la calidad de vida y la salud física. En la actualidad se considera una alternativa útil, el uso de plantas medicinales para el tratamiento de ciertas afecciones, entre ellas la depresión. Existen antecedentes de plantas medicinales con efecto antidepresivo. El objetivo fue evaluar la actividad antidepresiva de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Agg) y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp, Verbenaceae) en ratones, determinando la actividad antidepresiva aguda y a 7 días de ambos extractos. La evaluación de la actividad antidepresiva se llevó a cabo empleando ratones albinos suizos machos por medio de los ensayos de natación forzada y ensayo de suspensión de la cola. Se testaron dosis de 50, 100, 200 y 400 mg/kg de peso de los extractos etanólicos de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, Imipramina 32 mg/kg de peso como antidepresivo de referencia y vehículo (Tween 80 al 10%). Se observó una disminución en el tiempo de inmovilidad en los animales tratados con las diferentes dosis de los extractos de Agg y Avp de manera aguda y a 7 días, en el ensayo de desespero conductual. En base a estos resultados, se puede concluir que *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* presentan actividad antidepresiva en ratones al ser tratados de manera aguda y a 7 días, pudiendo estos resultados extrapolarse a la población humana, lo cual requiere la realización de estudios posteriores.

Palabras clave: depresión, antidepresivo, Verbenaceae, *Aloysia gratissima* var. *gratissima*, *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, tiempo de inmovilidad.

EVALUATION OF THE ANTIDEPRESSIVE ACTIVITY OF *Aloysia gratissima* var. *gratissima* and *Aloysia virgata* var. *platyphylla* IN MICE

Author: Teresa Dejesus Taboada Jara

Advisor: Prof. Dra. María Luisa Kennedy Rolón

ABSTRACT

Depression is one of the main contributors to the global burden of disease, it can have serious effects on social functioning, quality of life and physical health. At present, the use of medicinal plants is considered a useful alternative for the treatment of certain conditions, including depression. There is a long use of medicinal plants with antidepressant effects. The objective of this research was to evaluate the antidepressant activity of *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Agg) and *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp, Verbenaceae) in mice, determining the acute antidepressant activity and at 7 days of both extracts. Evaluation of antidepressant activity was carried out using male Swiss albino mice by means of the forced swimming tests and the tail suspension test. Doses of 50, 100, 200 and 400 mg/kg of weight of the ethanolic extracts of *Aloysia gratissima* var. *gratissima* and *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, Imipramine 32 mg/kg of body weight as reference antidepressant and vehicle (10% Tween 80). A decrease in the immobility time was observed in the animals treated with the different doses of the Agg and Avp extracts acutely and at 7 days, in the behavioral despair test. Based on these results, it can be concluded that *Aloysia gratissima* var. *gratissima* and *Aloysia virgata* var. *platyphylla* show antidepressant activity in mice when treated acutely and after 7 days, and these results can be extrapolated to the human population, which requires further studies.

Keywords: depression, antidepressant, Verbenaceae, *Aloysia gratissima* var. *gratissima*, *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, immobility time

1. INTRODUCCIÓN

La depresión es una de las principales causas de discapacidad a nivel mundial y uno de los mayores contribuyentes en la carga global de enfermedades (1). La prevalencia de la depresión en entornos de atención primaria ha sido determinada en un rango de 5-10% en diferentes países (2). La depresión puede tener efectos graves en el funcionamiento social, calidad de vida y salud física debido a asociaciones con enfermedades cardiovasculares, la causa principal a nivel mundial de muerte prevenible (3).

Los desórdenes mentales afectan a 350 millones de personas a nivel mundial, de los cuales el 40,5% resulta ser desórdenes depresivos (4). En Paraguay, se estima que alrededor del 5,23% de la población padece de trastornos depresivos, ocupando el cuarto lugar en América, superado solo por Estados Unidos, Brasil y Cuba (5). Desórdenes depresivos ligeros, moderados o severos, con o sin manifestación sintomática psicótica, son caracterizados por la presencia de ánimo depresivo, pérdida de interés y placer, falta de energía, sentimientos de culpa o baja autoestima, desórdenes de apetito y baja concentración (6). La evidencia demuestra que la depresión incrementa el riesgo de enfermedades cardiovasculares severas, incluyendo infarto al miocardio, infarto hemorrágico y enfermedad arterial periférica. Además, puede ser considerado un factor independiente igual de importante como los clásicos factores de riesgo para enfermedades crónicas (7). En dirección opuesta, la depresión puede surgir como resultado de limitaciones y discapacidades que conllevan enfermedades crónicas, generando un círculo vicioso entre los sentimientos depresivos y comorbilidades físicas (8). En cuanto a los comportamientos saludables, la asociación con condiciones depresivas se ha visto evidenciada por escasa actividad física y un estilo de vida sedentario (9,10) consumo excesivo de alcohol (11), tabaquismo (12,13) y hábitos alimenticios (14).

El conocimiento del uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos fue originario de culturas tribales indígenas (15–18) o antiguas civilizaciones como las que alguna vez se encontraron en Irán, India o China (15–17,19–21) y se pasó de generación en generación principalmente por comunicación oral. Actualmente, el conocimiento se encuentra limitado a pueblos y áreas rurales o por familias aisladas de centros urbanos (22).

Entre las plantas medicinales sudamericanas que actúan sobre el sistema nervioso, algunas familias resaltan por la mayor cantidad de citaciones en la literatura, entre ellas: Lamiaceae (24/138), Asteraceae (16/138) y Verbenaceae (6/138), que representan el 33,7% de las plantas medicinales analizadas. Según las encuestas etno farmacológicas, las indicaciones más comunes para el uso de estas fueron: calmante/sedante (72/167), analgésico (39/167) y dolor de cabeza (35/167), lo que representa el 86,2% de todas las indicaciones (18).

En estudios realizados por dos grupos distintos de investigadores, la especie *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke, perteneciente a la familia Verbenaceae manifiesta efecto antidepresivo en modelos en ratones y en peces respectivamente (23,24).

Es por todo lo expuesto que surge el interés en la búsqueda del efecto antidepresivo en las especies pertenecientes a la familia Verbenaceae, entre ellas *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, que cuentan con antecedente de presentar efecto sobre el sistema nervioso central. (25,26) Previamente, hemos evaluado el efecto sobre el comportamiento y la actividad ansiolítica en ratones (25,26), mostrando ambas especies un aumento en la actividad exploratoria y una actividad ansiolítica.

La especie *Aloysia gratissima* ha demostrado efecto antidepresivo, involucrando los sistemas monoaminérgicos en su efecto antidepresivo en un estudio llevado a cabo por Zeni et. al (27). Se debe notar que, los estudios fueron realizados en el extracto acuoso de la especie *A. gratissima*, no así en la variedad *A. gratissima* var. *gratissima*, además, la administración del extracto fue realizada de manera aguda (1 hora antes de la introducción al sistema), a diferencia del tratamiento realizado en este estudio, la administración fue llevada a cabo con tres dosis durante 24 horas (24, 18 y 1 hora antes de la introducción al sistema) y por 7 días consecutivos antes de ser introducidos al sistema. Actualmente, no existen estudios sobre la actividad antidepresiva de *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, sin embargo, estudios de dos diterpenos aislados de *Aloysia virgata* var. *platyphylla* llevado a cabo por Wasowski y colaboradores han demostrado efecto ansiolítico en ratones al

interactuar con el receptor GABA_A (28). Por todo lo expuesto, surge la necesidad de realizar estudios de evaluación del efecto antidepresivo en las especies *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, de manera a brindar a la población una alternativa terapéutica eficaz al tratamiento de una enfermedad tan ampliamente distribuida e incapacitante a nivel mundial.

1.1 Justificación

Considerando la amplia prevalencia de la depresión a nivel mundial, existe la necesidad de evaluar alternativas terapéuticas eficaces para disminuir la morbi-mortalidad de la enfermedad. El uso de plantas medicinales es ampliamente difundido en la población para el tratamiento de diversas afecciones, entre ellas la depresión.

Considerando que existe ya una especie, *Aloysia polystachya*, que manifestó efecto antidepresivo en estudios previos realizados, los antecedentes de ambas especies *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* sobre el Sistema Nervioso Central y que la especie *Aloysia gratissima* manifestó efecto antidepresivo en estudios realizados por otros investigadores. Además, se ha realizado un estudio sobre los diterpenos aislados de *A. virgata* var. *platyphylla* y se demostró el efecto ansiolítico. Por ello conviene evaluar la actividad antidepresiva de los extractos etanólicos de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en un modelo de tratamiento oral con tres dosis por 24 horas y otro modelo de tratamiento oral de dosis única por 7 días con el fin de aportar datos científicos.

Los resultados obtenidos luego de los experimentos propuestos darán soporte al uso de estas dos especies como tratamiento alternativo en pacientes con patología de depresión, y esto pondrá a disposición de la salud pública un recurso natural, económico, de fácil acceso y generalmente más aceptado por toda la población. Igualmente, brindará una alternativa terapéutica eficaz y segura para el tratamiento de la depresión. Adicionalmente, contribuye con la formación académica de recurso humano capacitado para la investigación.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Depresión

Los trastornos depresivos y de ansiedad son los más comunes entre los trastornos mentales, son muy prevalentes en la población. Estos afectan el estado de ánimo o los sentimientos de las personas afectadas, de manera leve a grave y puede durar meses o años. Unos 300 millones de personas sufren de depresión a nivel mundial (4,4% de la población mundial) y está calificada por la OMS como el principal contribuyente a la discapacidad mundial (7,5% de años vividos con discapacidad en el 2015), y es el principal contribuyente de las 800.000 muertes por suicidio por año (29).

Los trastornos depresivos se caracterizan por tristeza, pérdida de interés o placer, sentimientos de culpa o baja autoestima, trastornos del sueño o del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración. Puede ser duradera o recurrente, perjudica la capacidad laboral de una persona, la escuela o las situaciones cotidianas, y puede llevar al suicidio (29).

Se estima que, de los 322 millones de casos de depresión reportados a nivel mundial, 48,16 millones corresponden a los casos reportados en América (equivalente al 15% del total de casos a nivel mundial). A su vez, la depresión es más común entre mujeres que en hombres (5,1 y 3,6%, respectivamente, 28). En Paraguay, se estima que alrededor del 5,23% de la población padece de trastornos depresivos, ocupando el cuarto lugar en América, superado solo por Estados Unidos, Brasil y Cuba (5).

Las causas de la depresión son aún inciertas, sin embargo, se asocia a la depresión con otras enfermedades y condiciones de salud como enfermedades cardiovasculares severas,

como infarto al miocardio, infarto hemorrágico y enfermedad arterial periférica (7). Otros estudios manifiestan que uno de los principales causantes de insomnio o alteraciones en el sueño es la depresión (30). Por otra parte, existen otros estudios que relacionan la edad, con la incidencia de la depresión en la población, algunos de ellos estiman que gran proporción de adultos mayores con enfermedades crónicas de base o disfunciones cognitivas sufren de depresión, derivada de las enfermedades de base que estos poseen (31,32). La obesidad, también suele estar relacionada a la depresión, manifestándose un aumento del índice de masa corporal en niños y en adultos que cursan depresión (33,34). La depresión suele manifestarse además en mujeres que acaban de concebir, en algunos estudios mencionan que el 10-20% de las mujeres en Estados Unidos manifestaron depresión postparto no psicótica después de los 6 meses de haber concebido (35,36).

La depresión también se encuentra asociada a enfermedades reumatológicas, según estudios la prevalencia de síntomas depresivos en pacientes con enfermedades reumatológicas es del 93 % para pacientes con lupus eritematoso sistémico y 94% para pacientes con artritis reumatoidea (37). En un estudio llevado a cabo en Italia, algunos factores de riesgo para la depresión fueron: el consumo de alcohol, pacientes fumadores y obesos manifestaban cierta predisposición para manifestar depresión (38,39).

Actualmente se conoce que la depresión cursa con una disminución en la secreción de monoaminas, por lo tanto, todo compuesto que inhibe la recaptación de monoaminas, incrementando la concentración de monoaminas en el espacio sináptico ha demostrado ser útil para el tratamiento de la depresión. La inhibición de la monoamino oxidasa lo cual induce un incremento en la disponibilidad de monoaminas en las neuronas presinápticas también ha demostrado poseer efecto antidepressivo a nivel clínico. Estas observaciones llevaron al desarrollo de la teoría farmacológica más relevante con respecto a la depresión: la deficiencia de monoaminas como el principal causante de la depresión (40).

La teoría de la deficiencia de monoaminas resalta que la base fisiopatológica de la depresión es una disminución en la liberación de neurotransmisores como: serotonina, norepinefrina o dopamina en el sistema nervioso central (40).

La gran mayoría de los fármacos antidepressivos empleados actualmente tiene como blanco terapéutico el sistema monoaminérgico, sin embargo, la resistencia total o parcial de estas drogas a manifestar efecto antidepressivo o hacerlo de manera retardada en pacientes con depresión, podría indicar que la deficiencia monoaminérgica es solo un

causal de la depresión, y que existen otros blancos moleculares a tener en cuenta para el desarrollo de fármacos antidepresivos (40).

2.2 Tratamiento antidepresivo

Actualmente existe gran variedad de fármacos empleados para el tratamiento de la depresión. La primera generación de antidepresivos, los antidepresivos tricíclicos y los inhibidores de la monoamino oxidasa, los cuales incrementan las concentraciones de serotonina y norepinefrina, y son bastante efectivos aliviando los síntomas de la depresión. Ambos grupos de fármacos fueron empleados con mucho éxito por muchos años, sin embargo, existen efectos adversos graves que limitan su aplicación. Los antidepresivos tricíclicos actúan en muchos otros sistemas transmisores del sistema nervioso central y la periferia, por ejemplo, los sistemas histaminérgicos y acetilcolinérgicos, produciendo sedación, hipotensión, visión borrosa, sequedad bucal y otros efectos no deseados. Además, la sobredosis con antidepresivos tricíclicos puede poner en riesgo la vida y ser fatal para los pacientes especialmente por sus efectos a nivel cardiovascular. Por otra parte, los inhibidores de la monoamino oxidasa interactúan con la tiramina, pudiendo llegar a causar hipertensión potencialmente letal. El problema principal con estos efectos adversos es que lleva a los pacientes a consumir la medicación en una dosis no adecuada y por un periodo de tiempo menor, por lo cual permanecen como si nunca hubieran sido tratados (41).

Los inhibidores de la recaptación de la serotonina, sin embargo, muestran un mejor perfil en relación con los efectos adversos, debido a su selectividad por los receptores de serotonina. Inicialmente, al comparar con los antidepresivos tricíclicos, estos manifestaban en menor medida efectos adversos, podrían ser utilizados en poblaciones más susceptibles a los efectos adversos como ser los niños y ancianos y pacientes con comorbilidades. Sin embargo, este grupo de fármacos tampoco carece de efectos adversos, se reportan, aun así, algunos efectos adversos como: disfunción sexual, hiponatremia en adultos mayores, aumento de peso y efectos en el sueño, mareos, náuseas, letargia, dolor de cabeza ansiedad y agitación luego del retiro de la medicación. La administración conjunta de fármacos serotoninérgicos debe ser evitada, ya que puede producir el síndrome serotoninérgico, el cual puede poner en riesgo la vida del paciente (41).

Es por todo lo expuesto que la búsqueda de activos para el tratamiento de la depresión continúa a la actualidad, buscando también, alternativas de origen natural, con suficientes estudios que demuestren su utilidad en terapéutica para tratar la depresión.

2.3 Plantas medicinales para el tratamiento de la depresión.

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de ciertas afecciones deriva de las tribus indígenas o civilizaciones antiguas como las que se encuentran en China, India, y fue traspasado de generación en generación por comunicación verbal (18). La terapia basada en plantas medicinales puede ofrecer beneficios como efectos adversos reducidos, mayor autonomía en el tratamiento de las afecciones de los individuos, costos reducidos o nulos y fácil acceso para grupos de personas localizadas en áreas inaccesibles o alejadas de las zonas urbanas, que no tienen acceso a sistemas de salud (18).

Actualmente existe mucha evidencia de ensayos in vitro, en animales y estudios clínicos que reportan que las plantas medicinales pueden ser beneficiosas para tratar varias afecciones mentales, como la depresión, ansiedad e insomnio. Dentro de ellas se puede citar *Hypericum perforatum*, *Rhodiola rosea*, *Crocus sativus*, ofrecen tratamientos prometedores para la depresión por vías psicofarmacológicas bien conocidas incluidas la inhibición de la recaptación de monoaminas, mejorando la unión y sensibilización de los receptores de serotonina, inhibición de la monoamino oxidasa y modulación neuroendocrina. Incluso en ensayos clínicos, han demostrado ser más tolerables en cuanto a reacciones adversas para los pacientes (42). Estudios realizados en la especie *Kyllinga brevifolia*, han demostrado efectos antidepresivos con el extracto hidro-alcohólico y la fracción correspondiente al acetato de etilo, demostrando disminución en el tiempo de inmovilidad en el ensayo de desespero conductual (natación forzada) en ratones, tratados de manera aguda, por 7 días y 14 días con los extractos (43).

En una revisión bibliográfica realizada por investigadores, encontraron que las familias más citadas fueron Lamiaceae, Asteraceae y Verbenaceae, que representan el 33,7% del total de plantas medicinales analizadas en el trabajo (18).

2.4 Verbenaceae para el tratamiento de la depresión.

Se llevaron a cabo estudios en varias especies pertenecientes a la familia Verbenaceae reportando actividad farmacológica de las mismas y algunas de ellas también reportando actividad antidepresiva, que se mencionan a continuación.

Lippia sidoides, se llevaron a cabo estudios que indican la actividad antidepresiva de los aceites esenciales de la especie en ratones, utilizando el ensayo de natación forzada, campo abierto, test de suspensión de la cola, laberinto en cruz elevado y test de preferencia de la sucrosa. Se observó una reducción del tiempo de inmovilidad en el ensayo de natación forzada en los animales tratados por 14 días con los aceites esenciales de *L. sidoides* en comparación con el grupo control, también se observó esta disminución en el tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión de la cola, así como el incremento del número de cruzamientos en brazos abiertos, el porcentaje de entrada en brazos abiertos, el tiempo de permanencia en brazos abiertos y el porcentaje de permanencia en brazos abiertos. También, incrementó la preferencia a sucrosa, ensayo que se realiza para medir un comportamiento similar a la anhedonia, observando que el aceite esencial de *L. sidoides* incrementó la preferencia a la sucrosa (44).

Aloysia citradora (Cedrón Paraguay), se estudió el extracto hidroalcohólico en ratones utilizando el ensayo de suspensión de la cola, observando una disminución en el tiempo de inmovilidad de un grupo de animales tratados con una dosis de este extracto, dicha reducción fue similar a la del grupo tratado con fluoxetina, pudiendo llegar a tener actividad antidepresiva (45). En cuanto a la determinación de componentes de los aceites esenciales, llevada a cabo con muestras obtenidas de Argentina, Paraguay y Chile, se encontró igual patrón en aquellas muestras recolectadas en Argentina y Paraguay, sin embargo, se observaron variaciones en aquellas recolectadas de Chile, presentando mayor porcentaje de sabineno y 1-8 cineol (46).

El efecto ansiolítico y antidepresivo del aceite esencial de *Acantholippia desertícola*, una especie perteneciente a la familia Verbenaceae más común en Chile, fue estudiado por un grupo de investigadores. Se demostró una disminución de la actividad motora general, y el efecto ansiolítico al incrementar el número de entradas y el tiempo de permanencia en brazos abiertos en el ensayo de Laberinto en cruz elevado evaluado en ratas. Finalmente, evaluaron la actividad antidepresiva, observando un aumento en el tiempo de nado y una

disminución en el tiempo de inmovilidad en los animales tratados con el aceite esencial, indicando la posible actividad ansiolítica y antidepresiva de esta especie (47).

Verbena officinalis, otra especie perteneciente a la familia Verbenaceae, fue evaluada para determinar su composición farmacognóstica, la actividad antidepresiva y sus efectos sobre el comportamiento. El extracto acuoso de *V. officinalis* contiene polifenoles, flavonoides, taninos y terpenoides. Aquellos animales tratados con *V. officinalis* 200 mg/kg de peso disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad en el ensayo de natación forzada en ratas de manera similar a la fluoxetina, comparando con el grupo control negativo. Además, se observó una disminución en el tiempo de permanencia en el sector iluminado en la caja claro-oscuro (48).

Vitex megapotamica, popularmente conocida como taruma, es una especie que crece en territorio argentino, brasilero y paraguay, perteneciente a la familia Lamiaceae (previamente Verbenaceae). Se evaluó la actividad biológica del extracto crudo (etanol: agua 70:30), entre ellas se evaluó la actividad antidepresiva del extracto crudo en el ensayo de natación forzada en ratas, disminuyendo el tiempo de inmovilidad en los animales tratados con el extracto crudo luego de 7 días de administración (49).

Aloysia polystachya, conocida en Paraguay como burrito, también perteneciente a la familia Verbenaceae, demostró efecto antidepresivo. En este estudio se observó efecto antidepresivo del extracto concentrado de *A. polystachya* al tratar de manera aguda (1 hora antes del estudio) a grupos de ratones con una sola dosis de extracto (100 mg/kg de peso). Sin embargo, al administrar el extracto concentrado por 7 días, una vez al día, se observó disminución en el tiempo de inmovilidad de los animales tratados con 1, 10 y 100 mg/kg de peso, en el ensayo de desespero conductual o natación forzada. Al realizar la evaluación de la actividad antidepresiva de las fracciones del extracto concentrado de *A. polystachya*, la fracción en acetato de etilo demostró disminución en el tiempo de inmovilidad comparando con el vehículo (24).

El efecto antidepresivo del extracto hidroalcohólico de *A. polystachya* también fue evaluado en ratas, por medio del ensayo de desespero conductual (natación forzada), donde se observó una disminución en el tiempo de inmovilidad de los animales tratados con 12,5, 25 y 50 mg/kg de peso de *A. polystachya* comparado con el grupo control. Se observó un aumento en los comportamientos de nado y escape en los animales tratados con 25 y 50 mg/kg de peso de *A. polystachya* similar al de las ratas tratadas con imipramina y fluoxetina (50).

2.5 Antecedentes químicos y farmacológicos de *Aloysia gratissima*, *Aloysia gratissima* var. *gratissima*, *Aloysia virgata* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla*.

En extractos de *A. gratissima* se han encontrado kauranos, flavonoides, α -bisabolol, triterpenos como α -amirina, ácidos betulínico, oleanólico y ursólico. El contenido total de polifenoles y carotenoides fue mayor en las especies recolectadas en otoño y en invierno. Por el contrario, el contenido total de flavonoides fue mayor en las muestras recolectadas en primavera y otoño. El extracto acuoso de *Aloysia gratissima* demostró efecto antioxidante, relacionado con el contenido de polifenoles. Además, el extracto acuoso administrado a animales demostró no presentar efectos tóxicos, y no presentar efectos adversos graves en ratones (51).

En otro estudio sobre la composición fitoquímica de *A. gratissima*, se constató la ausencia de iridoides y la presencia de ent-kauranos y flavonoides metoxilados. El extracto metanólico de *A. gratissima* ha demostrado actividad anti edematogénica y antibacteriana, relacionada con la presencia de triterpenos, flavonoides y feniletanoides glicósidos (52,53).

La actividad ansiolítica, efectos sobre el comportamiento y evaluación de la toxicidad aguda del extracto metanólico de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* fue evaluada en ratones por Kennedy y colaboradores, se demostró la ausencia de signos y síntomas de toxicidad a las dosis testadas. No se observó efecto estimulante sobre el sistema nervioso central en el ensayo de tiempo de sueño inducido por barbitúricos. Así también, se demostró disminución en el tiempo de inmovilidad comparando el grupo tratado con el vehículo, y el incremento del cruzamiento en la periferia en el ensayo de campo abierto. Además, se observó un incremento en el tiempo y número de hurgonadas en el ensayo de caja perforada, y el incremento en el número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos en el ensayo de laberinto en cruz elevado, demostrando de esta manera el potencial efecto ansiolítico del extracto metanólico de *A. gratissima* (25).

El extracto acuoso de *Aloysia gratissima* demostró que disminuye el tiempo de inmovilidad en los animales tratados de manera aguda, en los ensayos de suspensión de la cola y natación forzada en ratones, evidenciando un efecto antidepresivo. Además, se evidenció el efecto neuroprotector ante el daño inducido al hipocampo por el glutamato.

El efecto antidepresivo mostró relacionarse con la interacción con los receptores de NMDA y la vía de señalización de L-Arginina-NO-cGMP (27). En el mecanismo además podría estar involucrado el sistema de recaptación de monoaminas, y el sistema adrenérgico, ya que el tratamiento previo con antagonistas revirtió el efecto antidepresivo de *A. gratissima*. Finalmente, el mecanismo de acción del extracto acuoso de *A. gratissima* demostró también tener relación con el sistema dopaminérgico, al inhibir el efecto anti inmovilidad del extracto acuoso con antagonistas de la dopamina (54).

En cuanto a *Aloysia virgata*, se han realizado estudios de caracterización fitoquímica del extracto metanólico del polvo de las hojas previamente secadas, observándose la presencia de hofmaniacetona, acetato de hofmaniacetona. Del polvo de las ramas se aislaron verbascósido, luteolina y arenariósido. Se aislaron feniletanoides, característicos de la familia Verbenaceae y kauranos, sin embargo, no se aisló iridoides del mencionado extracto. De los compuestos aislados, el arenariósido demostró efecto antibacteriano frente *S. aureus* y *M. luteus*, a diferencia del flavonol luteolina que demostró efecto antibacteriano solo frente a *M. luteus*. El extracto estudiado, además presenta actividad antiinflamatoria al reducir el porcentaje de inflamación en los materiales testados (55).

Se ha llevado a cabo la evaluación de los aceites esenciales de las partes aéreas de *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, observándose mayor proporción de sesquiterpenos, δ elemeno, β - cariofileno, germacreno D y biciclogermacreno como componentes principales. La composición química de estos aceites esenciales analizados demuestra variación cuantitativa debido a las condiciones ambientales locales y el periodo de colección (56).

La evaluación del efecto ansiolítico de dos diterpenos aislados de *Aloysia virgata* var. *platyphylla* fue llevada a cabo por Wasowski y colaboradores, por medio de un ensayo bioquímico denominado ensayo de unión de [3H]-flunitrazepam, ensayos comportamentales en ratones por medio de los ensayos de caja perforada, laberinto en cruz elevado, actividad locomotora y caja claro-oscuro. Ambos diterpenos mostraron afinidad moderada al sitio de unión de las benzodiazepinas del receptor GABA_A, uno de ellos incrementó el número y el tiempo de exploración en caja perforada, además de incrementar el porcentaje de entradas en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, indicando la posible actividad ansiolítica, a diferencia del otro diterpeno, el cual no demuestra efectos sobre el comportamiento en el ensayo de caja perforada y laberinto en cruz elevado, sin embargo, manifiesta un aumento en la actividad locomotora (28).

Finalmente, el estudio del efecto sobre el comportamiento y la actividad ansiolítica del extracto metanólico *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en ratones, fue llevado a cabo por investigadores del departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Asunción. En donde se observó un incremento en el número y tiempo de exploración en el ensayo caja perforada y un aumento en el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en laberinto en cruz elevado, indicando potencial actividad ansiolítica (26). Sin embargo, no se reportan estudios de la actividad antidepresiva en esta especie.

Es por todo lo mencionado y considerando los antecedentes fitoquímicos y farmacológicos anteriormente mencionados, surgió la necesidad de la evaluación de la actividad antidepresiva del extracto etanólico de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, de manera a brindar información suficiente para el uso seguro y efectivo de este recurso natural para el tratamiento coadyuvante de esta afección, ampliamente padecida a nivel mundial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad antidepresiva de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en ratones.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antidepresiva aguda con tres dosis por 24 horas y a 7 días de administración de los extractos etanólicos de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* mediante el ensayo de suspensión de la cola en ratones.
- Determinar la actividad antidepresiva aguda con tres dosis por 24 horas y a 7 días de administración de los extractos etanólicos *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en el ensayo de natación forzada en ratones.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio: Experimental

Población enfocada: Ratones albinos suizos machos (*Mus musculus*).

Población accesible: Ratones albinos suizos machos del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Asunción en el año 2020.

Criterio de inclusión: Ratones adultos machos, jóvenes, entre 25 y 35 g de peso corporal mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, climatizados a 23-25°C de temperatura y una humedad relativa del 40-70%

Criterio de exclusión: Ratones machos con manifestaciones anormales de salud, conductas bizarras, o que no cumplan con el régimen de peso mencionado.

Variable independiente: Tween 80 al 10% disuelto en agua destilada empleado para la disolución de los extractos previamente obtenidos (vehículo). Solución salina empleado como medio disolvente del Imipramina empleado como control positivo.

Variable dependiente: Manifestación o no de inmovilidad como signo de efecto antidepresivo.

Instrumento de medición: Observación clínica.

Tipo de Muestreo: No probabilístico por conveniencia.

Tamaño de la muestra: 96 animales (6-8 animales por grupo)

Hipótesis nula: Los extractos etanólicos de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* no presentan actividad antidepresiva.

Hipótesis alternativa: Los extractos etanólicos de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *Platyphylla* presentan actividad antidepresiva.

4.1 Preparación de muestras

Las partes aéreas de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Gillies & Hook. ex Hook.) Tronc. y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Briq.) Moldenke fueron recolectadas del Jardín de Aclimatación de Plantas nativas y medicinales de La Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Asunción, las mismas fueron identificadas por investigadores del departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Químicas y una muestra de herbario será depositada en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas. Luego de ser secadas a temperatura ambiente por 48 horas, en un ambiente aireado, protegido del sol y reducida a polvo fino, el extracto crudo se obtuvo macerando 200 g del polvo obtenido, en un baño con ultrasonido a 50°C, en 1000 ml de etanol por 15 minutos, repitiendo la operación tres veces. El extracto fue filtrado, sometido a reflujo tres veces y el exceso de solvente fue eliminado en un evaporador rotatorio, el extracto obtenido fue mantenido en un desecador hasta el momento de su uso. Los ensayos biológicos se llevaron a cabo con el material así obtenido. En base a los resultados de toxicidad aguda previamente reportados, se seleccionaron las dosis a ensayar, cuyos resultados son los reportados en este trabajo.

4.2 Animales

Fueron utilizados ratones albinos suizos machos y con pesos comprendidos entre 25 y 35 g. Los animales fueron mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, climatizados a 23-25°C de temperatura y una humedad relativa del 40-70%. Los animales tuvieron libre acceso a alimento y agua. La noche anterior a los experimentos, se retiraron los alimentos para tener animales en ayunas, pero con libre acceso a agua, salvo especificaciones en contrario. Los animales fueron sometidos a evaluaciones anteriores para determinar si manifestaban comportamientos anómalos que podrían interferir en los resultados, descartando aquellos que lo manifiesten.

4.3 Reactivos

Fue empleado Imipramina hidrocloreto obtenida del Laboratorio SIGMA ALDRICH-Alemania, Cloruro de Sodio, Etanol y Tween 80 de uso farmacéutico fueron adquiridas localmente.

4.4 Evaluación de la actividad antidepresiva

4.4.1 Ensayo de suspensión de la cola después del tratamiento oral con tres dosis en 24 horas, y tratamiento oral por 7 días

Los ratones machos adultos fueron sometidos al ensayo propuesto para evaluar posibles acciones antidepresivas. El procedimiento experimental consistió en suspender a los animales por la cola, por un periodo de 6 minutos, en el cual se registró el tiempo total de inmovilidad para cada animal, a partir del final del segundo minuto. El tratamiento con fármacos antidepresivos disminuye el tiempo de inmovilidad de los animales tratados con los mismos al comparar con el tiempo de inmovilidad de los animales tratados con vehículo, en el ensayo de suspensión de la cola (57). En este estudio, se analizó el efecto de los extractos luego de la administración de tres dosis en 24 horas, y luego de siete días de administración.

En el primer caso, fueron empleados 6 grupos de 6-8 ratones por cada extracto en estudio. Los mismos fueron tratados con vehículo (tween 80 al 10%; 0,1 ml/10 g de peso, vía oral), los extractos (*Agg* y *Avp* 50,100, 200 y 400 mg/kg, vía oral), e Imipramina (Im. 32 mg/kg, vía intraperitoneal), 24, 18 y 1 hora antes de ser sometidos individualmente al ensayo de suspensión de la cola (24).

En el segundo caso, otros 6 grupos de animales de 6-8 ratones por cada extracto fueron tratados por 7 días con el vehículo (tween 80 al 10%; 0,1 ml/10 g de peso, vía oral), los extractos (*Agg* y *Avp* 50,100, 200 y 400 mg/kg, vía oral), e Imipramina (Im. 32 mg/kg, vía intraperitoneal). En el séptimo día, luego de una hora de la última administración, fueron sometidos individualmente al mismo procedimiento de suspensión de la cola (43).

4.4.2 Ensayo de natación forzada después del tratamiento oral con tres dosis en 24 horas, y tratamiento oral por 7 días

Los animales tratados como se detalló en el apartado anterior con vehículo, el extracto de *A. gratissima* var. *gratissima* o *A. virgata* var. *platyphylla*, e imipramina; luego de ser sometidos al ensayo de suspensión caudal fueron observados en el ensayo de natación forzada. Para ello, fueron introducidos individualmente en un cilindro de 25 cm de alto y 15 cm de diámetro conteniendo 12,5 cm de agua mantenida entre los 21-24 °C. La sesión es de 6 min de duración y la inmovilidad, el tiempo de conducta de escape y tiempo de nado fueron registrados mediante filmación y luego contabilizados, a partir del final del segundo minuto (57,58). La inmovilidad se considera cuando un ratón realiza los movimientos mínimos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua. La conducta de escape (climbing) se define como movimientos de las patas delanteras hacia arriba a lo largo del lado del cilindro de natación. La conducta de nado (swimming) se define como movimiento usualmente horizontal a través del cilindro de natación que suele incluir cruzamientos en otro cuadrante. Los fármacos antidepresivos disminuyen el tiempo de inmovilidad en el ensayo de natación forzada de los animales tratados con los mismos al comparar con el tiempo de inmovilidad de los animales tratados con vehículo. Adicionalmente, el incremento en la conducta de escape podría orientar sobre otros efectos sobre el SNC o el mecanismo de la acción antidepresiva, y el tiempo de nado es inversamente proporcional a la inmovilidad (58, 59).

En este tipo de estudios el control de calidad se realiza al comparar con un grupo de animales que recibe el vehículo (control) y otro grupo que recibe el antidepresivo de referencia, en este caso, imipramina.

4.5 Gestión y análisis de los datos

Los datos obtenidos en los diferentes grupos en estudio fueron expresados como promedios \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un programa estadístico (GraphPrism Version 7) empleando ANOVA de una vía, seguida de test de comparación múltiple de Dunnett. Un nivel de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4.6 Asuntos éticos

Al tratarse de un estudio experimental con animales de laboratorio, se consideró a los mismos como reactivos biológicos y se trabajó de acuerdo a las normas establecidas en la comisión de ética de la comunidad europea. El manejo de los animales se realizó por procedimientos estandarizados y la regla básica a seguir es que “todo animal tratado debe ser sacrificado”. El protocolo fue aprobado por el Comité de ética de investigación de la Facultad de Ciencias Químicas, UNA (Código 718/2021). Se utilizó para los ensayos el número mínimo necesario, y el menor tiempo de duración de la observación requerida para obtener datos consistentes. Cada animal fue empleado una vez (60).

5 RESULTADOS

5.1 Efecto del tratamiento oral con tres dosis por 24 horas con el extracto de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* en el ensayo de suspensión de la cola

Al evaluar la actividad antidepresiva por medio del ensayo de suspensión de la cola se obtuvieron los resultados expresados en la figura 1. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de inmovilidad del grupo de animales tratado con imipramina, al ser comparado con los animales tratados con vehículo ($40,5 \pm 7,5$ seg; $110,1 \pm 21,6$ seg, respectivamente; $p < 0,0001$), con esto se demuestra la validez del método para evaluar la posible actividad antidepresiva de una muestra en estudio. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con el extracto de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* a 50,100,200 y 400 mg/kg de peso y el grupo tratado con el vehículo (ver figura 1).

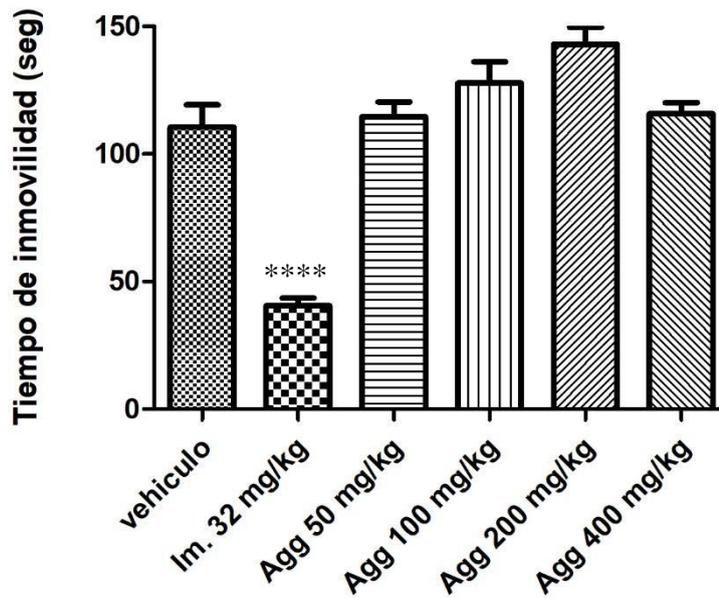


Figura 1. Tiempo de inmovilidad (seg) en el ensayo de suspensión de la cola en los grupos tratados oralmente con tres dosis en 24 horas con *Aloysia gratissima* var. *gratissima*. (Agg). Im.: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. **** $p < 0,0001$.

5.2 Efecto del tratamiento oral por 7 días con extracto de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* en el ensayo de suspensión de la cola.

Al evaluar la actividad antidepresiva en los animales tratados por 7 días por medio del ensayo de suspensión de la cola se obtuvieron los resultados expresados en la figura 2. El resultado más relevante en este estudio es la diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con 50 mg/kg del extracto de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y el grupo vehículo (86,1 \pm 29,7 seg; 130,3 \pm 22,3 seg, respectivamente; $p < 0,01$). Se observó también una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de inmovilidad del grupo de animales tratados con imipramina al comparar con el vehículo (40,4 \pm 25,2 seg; 130,3 \pm 22,3 seg, respectivamente; $p < 0,0001$), validando de esta manera el método para la determinación de sustancias antidepresivas.

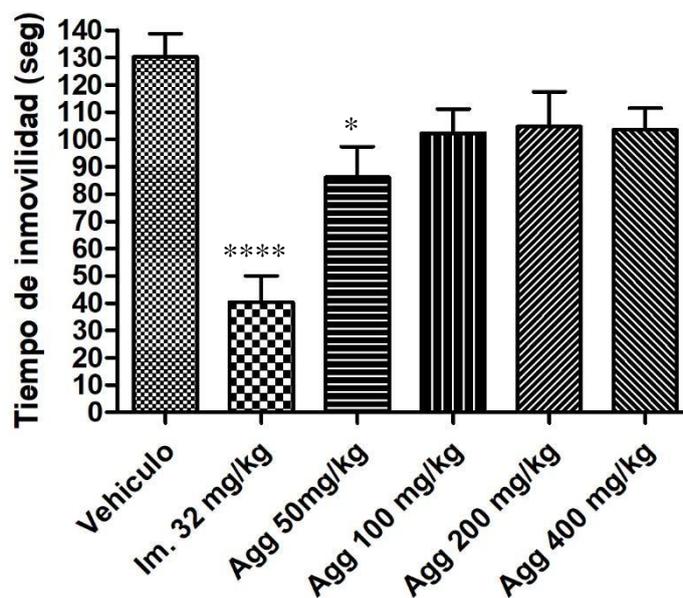


Figura 2. Tiempo de inmovilidad (seg) en el ensayo de suspensión de la cola en los grupos tratados oralmente por 7 días con *Aloysia gratissima* var. *gratissima*. (Agg). Im.: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

5.3 Efecto en los parámetros evaluados en natación forzada luego del tratamiento oral con tres dosis en 24 horas de *Aloysia gratissima* var. *gratissima*

Al evaluar la actividad antidepresiva por medio del ensayo de natación forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 3. El resultado más relevante observado en este ensayo fue la diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con 200 mg/kg del extracto de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y el grupo vehículo ($64,7 \pm 32,6$ seg; $115,1 \pm 21,9$ seg. respectivamente; $p < 0,05$, figura 3). Se observó, además, una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de inmovilidad del grupo de animales tratado con imipramina y el tratado con vehículo ($37,0 \pm 20,6$ seg; $115,1 \pm 21,9$ seg. respectivamente; $p < 0,001$), validando de esta manera el método para la determinación de potenciales antidepresivos.

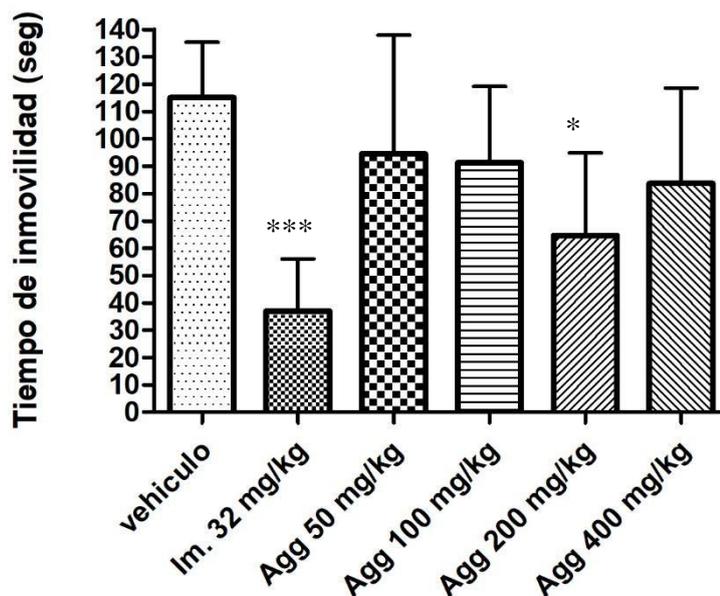


Figura 3. Tiempo de inmovilidad (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente con tres dosis por 24 horas con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Agg). Im.: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Al evaluar el tiempo de conducta de escape por medio del ensayo de Natación Forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 4. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de conducta de escape del grupo de animales tratado con imipramina, los animales tratados con las diferentes dosis de extracto etanólico de *A. gratissima* var. *gratissima* y los animales tratados con el vehículo. Si bien se observó un aumento en el tiempo de conducta de escape en los animales tratados con 50 y 100 mg/kg de *A. gratissima* var. *gratissima*, comparado con el grupo de animales tratado con vehículo, esta diferencia no es estadísticamente significativa (figura 4).

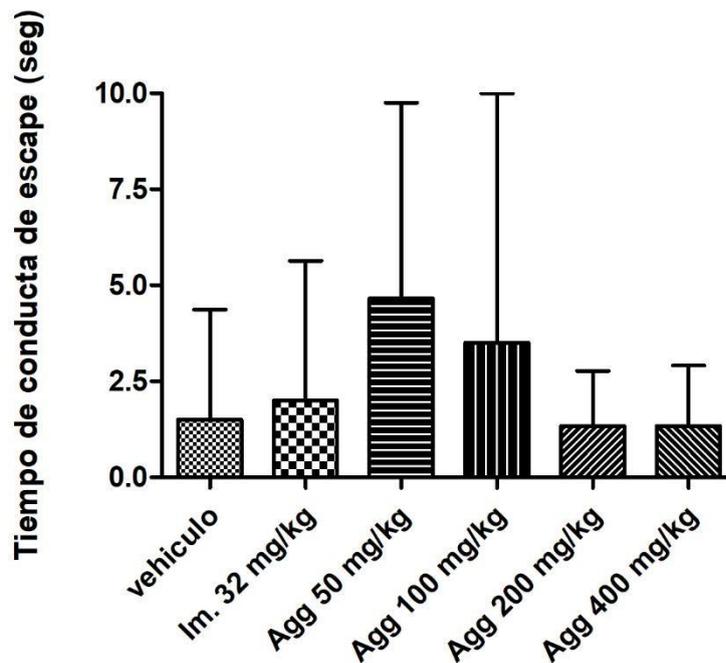


Figura 4. Tiempo de conducta de escape (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente con tres dosis por 24 horas con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Agg). Im: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett.

Al evaluar el tiempo de conducta de nado en el ensayo de natación forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 5. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de conducta de nado del grupo de animales tratados con imipramina y los animales tratados con el vehículo; y entre el grupo de animales tratados con 200 mg/kg de *A. gratissima* var. *gratissima* y el grupo vehículo (Veh: $120,8 \pm 21,4$ seg; Im: $197,0 \pm 19,0$ seg $p < 0,001$; Agg 200 mg/kg: $180,3 \pm 29,8$ seg; $p < 0,01$, ver figura 5).

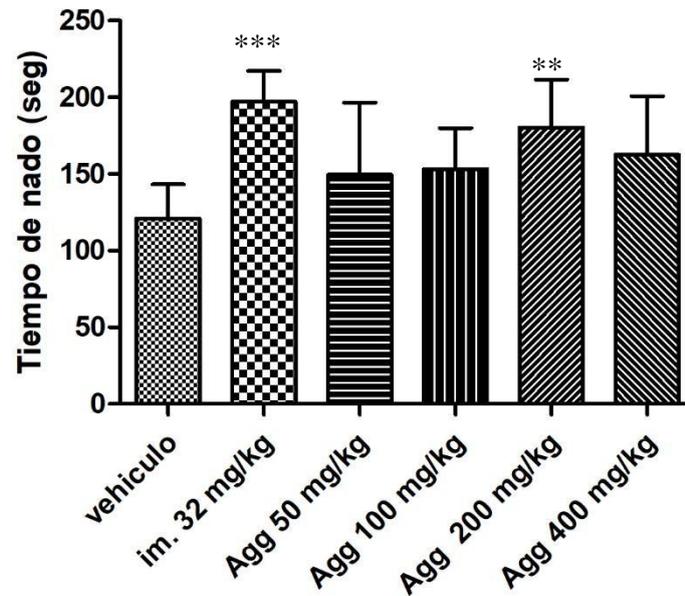


Figura 5. Tiempo de nado (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados con tres dosis en 24 horas, con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Agg). Im.: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5.4 Efecto en los parámetros de natación forzada luego del tratamiento oral por 7 días con *Aloysia gratissima* var. *gratissima*

Al evaluar la actividad antidepresiva en los animales tratados durante 7 días por medio del ensayo de natación forzada se obtuvieron los resultados expresados siguientes. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con 50, 100, 200 y 400 mg/kg del extracto de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y el grupo vehículo (57,0 \pm 32,8 seg; 60,3 \pm 29,4 seg; 44,2 \pm 17,0 seg; 49,5 \pm 20,8 seg; 179,3 \pm 37,6 seg, $p < 0,0001$, respectivamente). Se observó igualmente diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de inmovilidad del grupo de animales tratados con imipramina (40,5 \pm 21,7 seg; $p < 0,0001$) y los animales tratados con vehículo, validando de esta manera el método para la evaluación de potenciales antidepresivos (figura 6). La disminución en el tiempo de inmovilidad de los animales tratados con las diferentes dosis de extracto de *A. gratissima* var. *gratissima*, aparentemente, no es dependiente de la dosis, puesto que en todas las

todas las dosis ensayadas se observó aproximadamente el mismo % de reducción. Como dato interesante, se resalta también que la reducción observada con todas las dosis del extracto es similar a la imipramina, que reduce la inmovilidad en 77%, y con las dosis del extracto el promedio de reducción es casi del 70%.

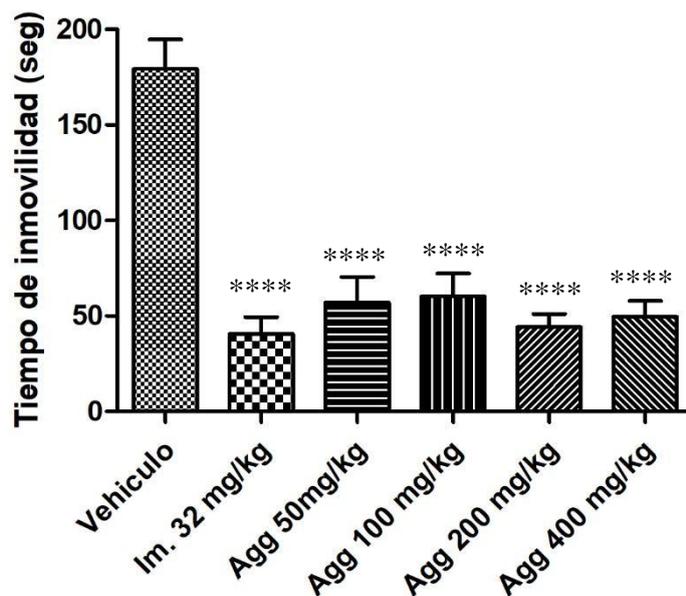


Figura 6. Tiempo de inmovilidad (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente por 7 días con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Agg). Im.: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. **** $p < 0,0001$.

Al evaluar el tiempo de conducta de escape por medio del ensayo de Natación Forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 7. No se observó diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de conducta de escape del grupo de animales que fue tratado con imipramina, los animales tratados con 50, 100, 200 y 400 mg/kg del extracto de *A. gratissima* var. *gratissima* al ser comparados con el grupo que recibió el vehículo.

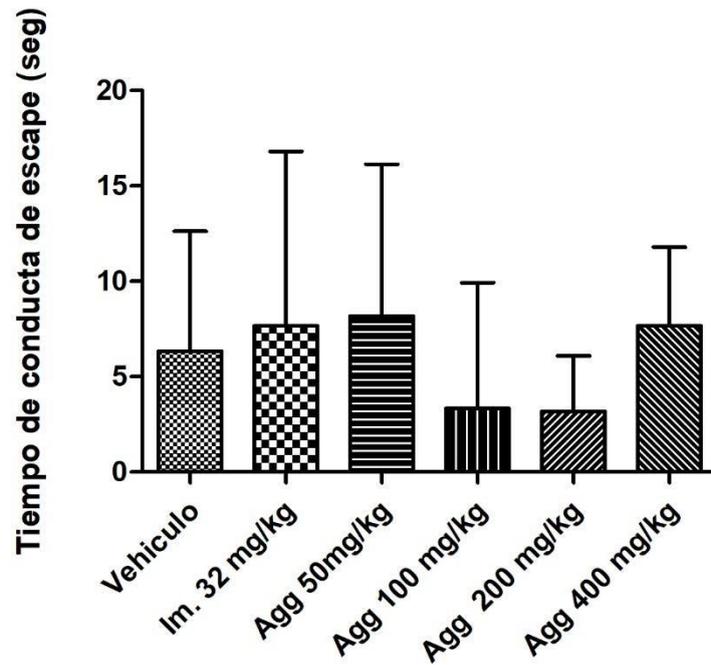


Figura 7. Tiempo de conducta de escape (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente por 7 días con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Agg). Im: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett.

Al evaluar el tiempo de conducta de nado por medio del ensayo de Natación Forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 8. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de conducta de nado del grupo de animales tratados por 7 días con 50, 100, 200 y 400 mg/kg de *A. gratissima* var. *gratissima* y los animales tratados con vehículo. Se observó adicionalmente, diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de nado en los animales tratados con imipramina y los animales tratados con vehículo, validando de esta manera el método para la determinación de potenciales antidepresivos (Veh: 53,3 \pm 38,9 seg; Im: 191,8 \pm 22,5 seg; Agg 50: 174,8 \pm 30,1 seg; Agg 100: 176,3 \pm 32,3 seg; Agg 200: 192,7 \pm 16,7 seg y Agg 400: 182,8 \pm 19,1 seg; $p < 0,0001$, figura 8). El aumento en la conducta de nado observado con las diferentes dosis del extracto fue similar al de la imipramina.

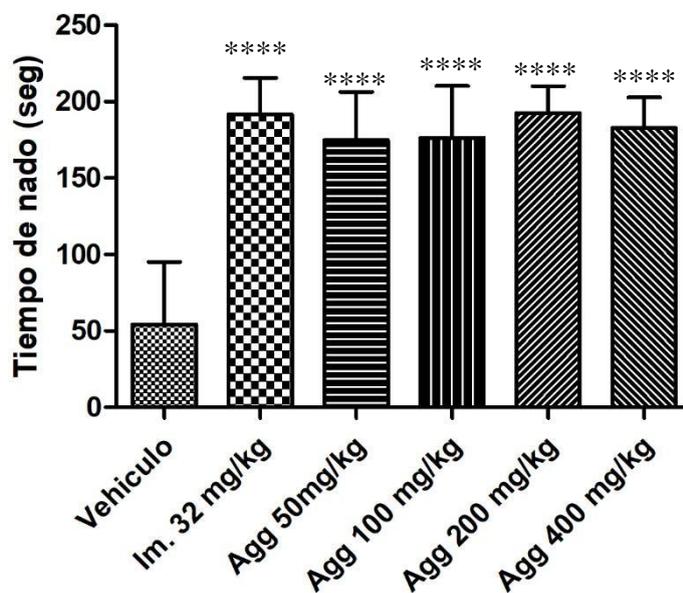


Figura 8. Tiempo de nado (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente por 7 días con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Agg). Im.: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. **** $p < 0,0001$.

5.5 Efecto del tratamiento oral con tres dosis por 24 horas con el extracto de *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en el ensayo de suspensión de la cola

Al evaluar la actividad antidepresiva por medio del ensayo de suspensión de la cola se obtuvieron los resultados expresados en la figura 9. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de inmovilidad del grupo de animales tratado con imipramina y los animales tratados con vehículo ($40,5 \pm 7,5$ seg; $110,1 \pm 21,6$ seg respectivamente; $p < 0,0001$), validando de esta manera el método para la determinación de potenciales candidatos antidepresivos. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con las diferentes dosis de extracto de *Aloysia virgata* var. *platyphylla* y el grupo tratado con el vehículo (ver figura 9).

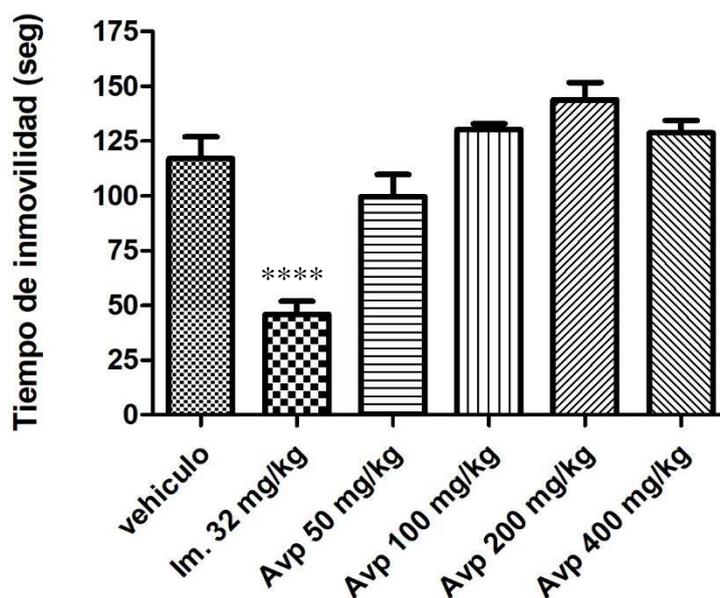


Figura 9. Tiempo de inmovilidad (seg) en el ensayo de suspensión de la cola en los grupos tratados oralmente con tres dosis en 24 horas con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp). Im.: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. **** $p < 0,0001$.

5.6 Efecto del tratamiento oral por 7 días con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en el ensayo de suspensión de la cola

Al evaluar la actividad antidepresiva en los animales tratados por 7 días por medio del ensayo de suspensión de la cola se obtuvieron los resultados expresados en la figura 10. El resultado más resaltante en este ensayo fue la diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con 50 y 100 mg/kg del extracto de *Aloysia virgata* var. *platyphylla*. y los animales tratados con vehículo ($84,3 \pm 34,8$ seg; $83,5 \pm 28,5$ seg ; $134,2 \pm 21,7$ seg. respectivamente; $p < 0,05$). Si bien se observó también una reducción de la inmovilidad en los animales que recibieron 200 y 400 mg/kg del extracto, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (ver figura 10). Se observó asimismo, una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de inmovilidad del grupo de animales tratado con imipramina y los animales tratados con vehículo ($32,7 \pm 16,1$ seg; $134,2 \pm 21,7$ seg respectivamente; $p < 0,0001$), validando de esta manera el método para la determinación de sustancias antidepresivas.

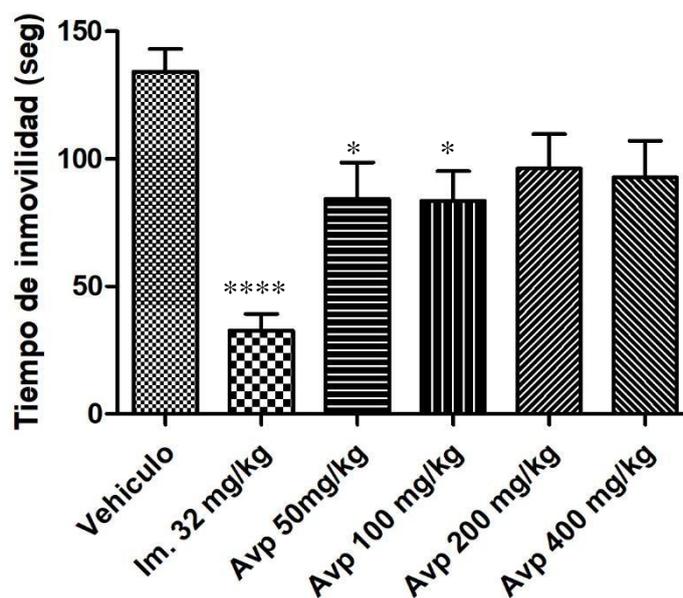


Figura 10. Tiempo de inmovilidad (seg) en el ensayo de suspensión de la cola en los grupos tratados oralmente por 7 días con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp). Im: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

5.7 Efecto en los parámetros de natación forzada luego del tratamiento oral con tres dosis en 24 horas de *Aloysia virgata* var. *platyphylla*

La actividad antidepresiva fue evaluada también por medio del ensayo de natación forzada, los resultados obtenidos se detallan a continuación. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con 50, 100, 200 y 400 mg/kg de *Aloysia virgata* var. *platyphylla* y los animales tratados con vehículo ($45,3 \pm 29,6$ seg $p < 0,001$; $53,7 \pm 42,0$ seg $p < 0,01$; $43,5 \pm 13,5$ seg $p < 0,001$; $50,7 \pm 12,6$ seg $p < 0,01$; $118,8 \pm 21,5$ seg. respectivamente). También se hizo evidente una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de inmovilidad del grupo de animales tratado con imipramina y los animales tratados con vehículo ($31,3 \pm 15,5$ seg; $118,8 \pm 21,5$ seg respectivamente; $p < 0,0001$), validando de esta manera el método para la determinación de potenciales antidepresivos. La disminución en el tiempo de inmovilidad

de los animales tratados con las diferentes dosis de extracto de *A. virgata* var. *platyphylla*, aparentemente, no es dependiente de la dosis, ya que es muy similar la reducción observada con todas las dosis ensayadas. Es interesante señalar que la reducción observada con el extracto, con todas las dosis, es similar a la imipramina. Esta última reduce la inmovilidad en 73%, y con las dosis del extracto el promedio de reducción es alrededor de 60%.

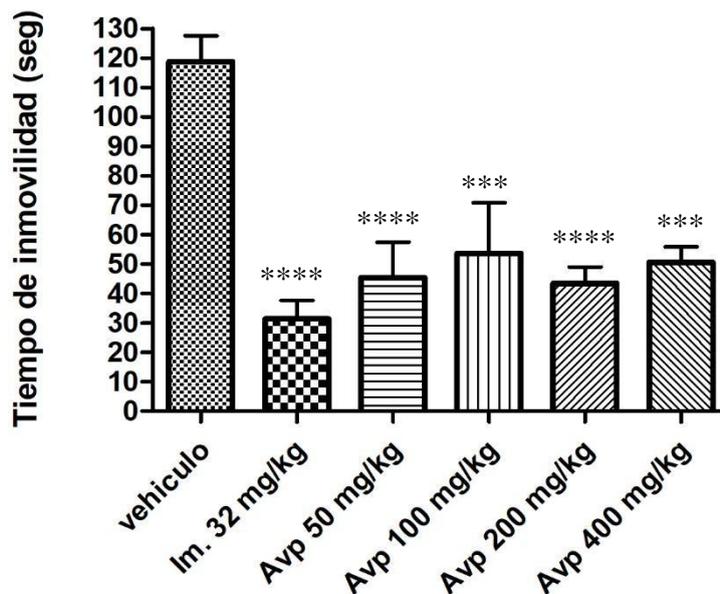


Figura 11. Tiempo de inmovilidad (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente con tres dosis por 24 horas con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp). Im: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Al evaluar el tiempo de conducta de escape por medio del ensayo de natación forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 12. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de conducta de escape del grupo de animales tratados con 50, 100, 200 y 400 mg/kg de *A. virgata* var. *platyphylla*, e imipramina al comparar con los animales tratados con vehículo (ver figura 12).

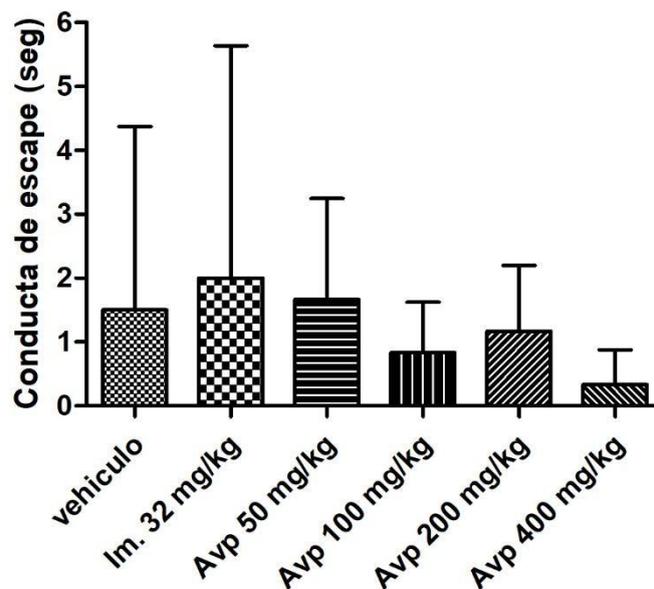


Figura 12. Tiempo de conducta de escape (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente con tres dosis por 24 horas con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp). Im: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett.

Al evaluar el tiempo de conducta de nado por medio del ensayo de Natación Forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 13. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de conducta de nado de los animales tratados con 50, 100, 200 y 400 mg/kg *A. virgata* var. *platyphylla*, los animales tratados con imipramina y los animales tratados con vehículo (Avp 50: $193,0 \pm 29,7$ seg $p < 0,001$; Avp 100: $185,5 \pm 42,6$ seg $p < 0,001$; Avp 200: $195,7 \pm 14,2$ seg. $p < 0,0001$; Avp 400: $188,8 \pm 12,4$ seg. $p < 0,001$; Im: $197,2 \pm 19,0$ seg. $p < 0,0001$; Veh: $120,3 \pm 20,8$ seg, ver figura 13). Se observó un aumento similar en el tiempo de conducta de nado en los animales tratados con imipramina y *A. virgata* var. *platyphylla* comparado con el grupo vehículo. Tal como se esperaba para este parámetro cuantificado, el porcentaje de incremento en el tiempo de conducta de nado es similar con entre todas las dosis ensayadas y también con la imipramina. Estos resultados son, además, inversamente proporcionales al tiempo de inmovilidad previamente descrito.

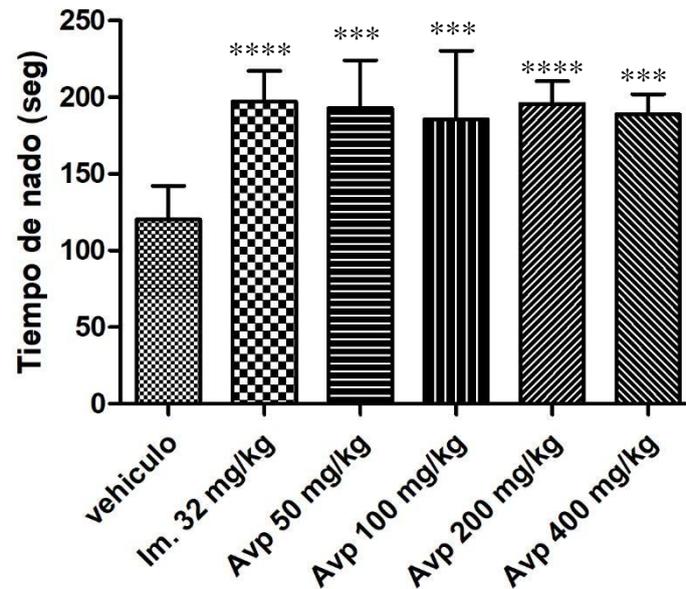


Figura 13. Tiempo de nado (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente con tres dosis en 24 horas con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp). Im: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.8 Efecto en los parámetros de natación forzada luego del tratamiento oral por 7 días con *Aloysia virgata* var. *platyphylla*

Al evaluar la actividad antidepresiva en los animales tratados por 7 días por medio del ensayo de natación forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 14. Se observó una disminución en el tiempo de inmovilidad y una diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con 50, 100, 200 y 400 mg/kg de *Aloysia virgata* var. *platyphylla* y los animales tratados con vehículo ($22,2 \pm 19,6$ seg; $23,8 \pm 9,2$ seg; $30,0 \pm 17,3$ seg; $6,2 \pm 4,8$ seg; $179,3 \pm 37,6$ seg respectivamente; $p < 0,0001$, ver figura 14). Adicionalmente, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de inmovilidad del grupo de animales tratado con imipramina y los animales tratados con vehículo ($40,5 \pm 21,7$ seg; $179,3 \pm 37,6$ seg respectivamente; $p < 0,0001$), validando de esta manera el método para la determinación de potenciales sustancias antidepresivas.

Por un lado, se destaca la disminución en el tiempo de inmovilidad de los animales tratados con las diferentes dosis de extracto de *A. virgata* var. *platyphylla*, aparentemente, no es dependiente de la dosis, aunque con la dosis más alta ensayada se observó un tiempo de reducción de inmovilidad más marcado. Por otro lado, con las dosis 50, 100 y 200 mg/kg de Avp, la reducción observada es de aproximadamente 85%, mayor a la observada con imipramina la cual fue de un 77%, y con 400 mg/kg de Avp el tiempo de inmovilidad se redujo hasta un 96,5%, que es mucho mayor a la obtenida con el antidepresivo de referencia, imipramina.

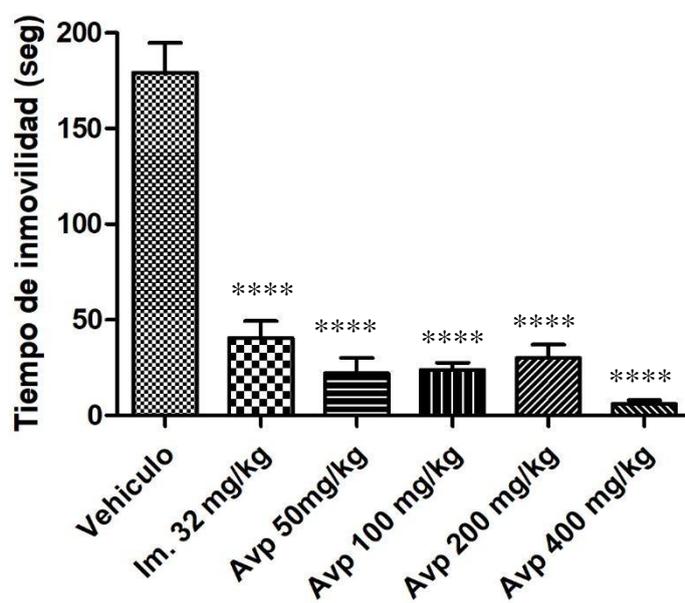


Figura 14. Tiempo de inmovilidad (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente por 7 días con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp). Im: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. **** $p < 0,0001$.

Al evaluar el tiempo de conducta de escape por medio del ensayo de Natación Forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 15. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de conducta de escape de los animales tratados durante 7 días con las diferentes dosis de *A. virgata* var. *platyphylla*, ni con los que fueron con imipramina al compararlos con los animales del grupo que recibió vehículo (ver figura 15).

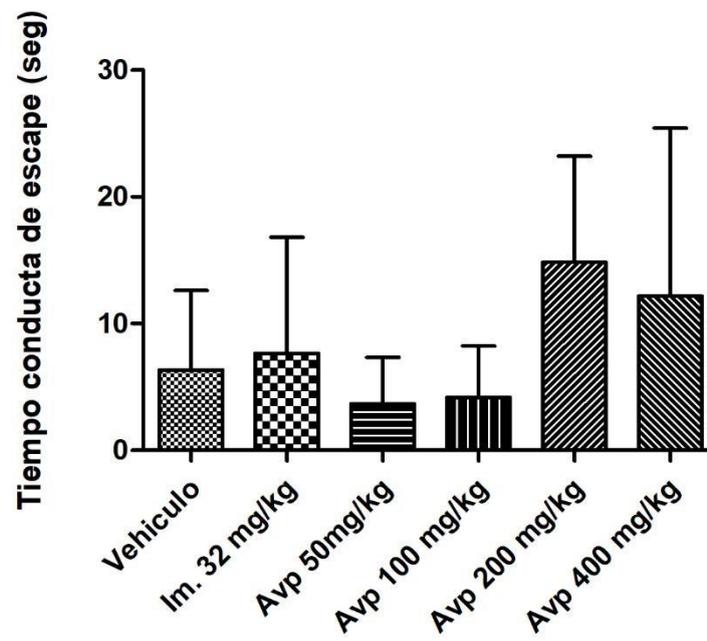


Figura 15. Tiempo de conducta de escape (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente por 7 días con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp). Im: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett.

Al evaluar el tiempo de conducta de nado por medio del ensayo de natación forzada se obtuvieron los resultados expresados en la figura 16. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de conducta de nado del grupo de animales tratados durante 7 días con 50, 100, 200 y 400 mg/kg de *A. virgata* var. *platyphylla* y los animales tratados con imipramina al compararlos con los animales tratados con el vehículo ($214,2 \pm 21,4$ seg; $212,0 \pm 10,06$ seg; $195,2 \pm 13,3$ seg $222,0 \pm 15,5$ seg; $191,8 \pm 22,5$ seg; $54,3 \pm 38,9$ seg respectivamente, $p < 0,0001$, ver figura 16). Se observó un aumento más evidente en el tiempo de conducta de nado en los animales tratados con *A. virgata* var. *platyphylla* que con la imipramina. Tal como se esperaba para este parámetro cuantificado, el porcentaje de incremento en el tiempo de conducta de nado es inversamente proporcional al tiempo de inmovilidad previamente descrito.

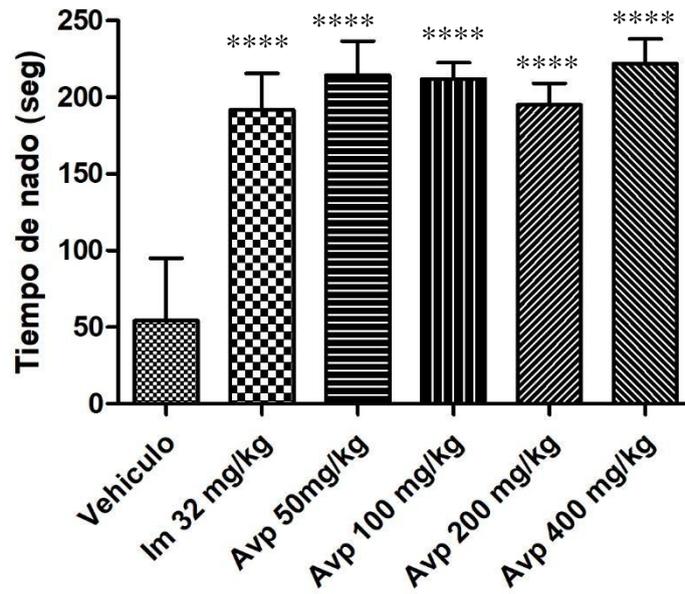


Figura 16. Tiempo de nado (seg) en el ensayo de natación forzada en los grupos tratados oralmente por 7 días con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Avp). Im: imipramina. Los datos corresponden al promedio \pm SD. ANOVA de una vía, post test de Dunnett. **** $p < 0,0001$.

6 DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos luego de tratar a los distintos grupos de animales con tres dosis en 24 horas, del extracto etanólico de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en el ensayo de suspensión de la cola, se observó diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de inmovilidad en segundos en los animales tratados con imiprimina y el vehículo. Por otro lado, luego del tratamiento de los distintos grupos de animales con el extracto etanólico de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, 24, 18 y 1 h antes del ensayo, se observó en el ensayo de natación forzada que hubo diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de inmovilidad en los animales tratados con el antidepresivo de referencia y el vehículo. Esto también se verificó luego del tratamiento por 7 días, demostrando de esta manera que los métodos empleados son capaces de identificar potencialmente útiles para el tratamiento de la depresión (58,59,61).

Zeni et al. evaluaron el efecto del extracto acuoso de *Aloysia gratissima* luego de una única dosis en ratones, y encontraron una disminución en el tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión de la cola. También reportaron disminución en el tiempo de inmovilidad en el ensayo de natación forzada en los grupos de animales tratados con una sola dosis, en el ensayo de natación forzada (54). Al evaluar la actividad antidepresiva del extracto de *A. gratissima* var. *gratissima* se observó una disminución estadísticamente significativa en el tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión de la cola, del grupo de animales tratados con 50 mg/kg, por 7 días ($p < 0,05$) en relación con el grupo que recibió vehículo. En el ensayo de natación forzada, con 200 mg/kg de *A. gratissima* var. *gratissima* luego que los animales fueron tratados con tres dosis en 24 horas, también reduce significativamente el tiempo de inmovilidad ($p < 0,05$).

Por otro lado, en el ensayo de natación forzada llevado a cabo luego del tratamiento de los animales por 7 días, se observó reducción del tiempo de inmovilidad con todas las dosis de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* ensayadas, al comparar con el vehículo ($p < 0,0001$), y estos tiempos son mucho menores a los obtenidos en el ensayo de 24 horas y de los obtenidos por Zeni y colaboradores para *A. gratissima* (54). Es interesante notar que los porcentajes de reducción que se obtuvieron son similares a la imipramina, de alrededor del 70%, estos resultados no muestran una relación de dependencia de la dosis.

En cuanto a la conducta de escape en el ensayo de natación forzada, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de animales tratados con vehículo, imipramina ni los grupos de animales tratados con las diferentes dosis testadas de *A. gratissima* var. *gratissima*. En cuanto a la conducta de nado, sí se observó un aumento estadísticamente significativo (swimming) en los animales tratados con *A. gratissima* var. *gratissima*, que es esperable considerando los resultados en cuanto al tiempo de inmovilidad. Estos resultados obtenidos con *A. gratissima* var. *gratissima* concuerdan con lo reportado por Kennedy y colaboradores (25), que demostraron que este extracto no evidenció efecto estimulante sobre el SNC en el ensayo de tiempo de sueño inducido por barbitúricos, y parece indicar que la actividad antidepresiva de *A. gratissima* var. *gratissima* posiblemente podría estar relacionada al mecanismo de acción de la imipramina, antidepresivo tricíclico que ejerce su efecto al inhibir de manera no selectiva la recaptación tanto de noradrenalina como de serotonina (58,59). Costa y colaboradores en 2013, demostraron que el tiempo de conducta de escape medido en ratones albinos suizos podría distinguir entre potenciales estimulantes del SNC y antidepresivos, y adicionalmente orienta también el posible mecanismo de la acción antidepresiva (58).

Todo esto concuerda también parcialmente con lo reportado por Zeni y colaboradores luego de la administración de una dosis de *A. gratissima*. Cabe resaltar que para este estudio se empleó un extracto en etanol de una variedad, *A. gratissima* var. *gratissima*, a partir de la planta recolectada en verano, además de contar con diferencias en las condiciones ambientales y de alimentación de los ratones albinos suizos provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas empleados (27,52). Moroni y colaboradores han descrito para *A. gratissima* un complejo de 4 variedades, esto probablemente contribuye a una variación en la composición de metabolitos secundarios y por ende en el efecto en el tiempo de inmovilidad observado (54,63). También se describen otras diferencias en cuanto a la metodología empleada, ya que los mismos mencionan

aislamiento visual y acústico, además de la suspensión de los animales a unos 50 cm de altura por encima del nivel del suelo, sujetos por medio de cinta adhesiva a 1 cm de la punta de la cola. En nuestros experimentos, el aislamiento acústico no fue factible, y la suspensión de los animales se realizó a una distancia aproximada de 60-75 cm del nivel del suelo, por medio de cinta adhesiva a 3 cm de la base de la cola (54).

Al extracto acuoso de *A. gratissima* estudiado por Zeni y colaboradores, se le podría atribuir el efecto agudo antidepressivo encontrado en el ensayo de suspensión de la cola mecanismos relacionados a la interacción con los sistemas serotoninérgicos (5-HT_{1A} y 5-HT_{2A-2C}), dopaminérgicos (receptores D₁ y D₂) y noradrenérgicos (α_1 y α_2 adrenoreceptores) (27), ya que este método resultó efectivo en la determinación de sustancias activas para el tratamiento de la depresión por medio de estas vías de señalización (64). Teniendo en cuenta esto, y las diferencias con los resultados obtenidos en el presente estudio con el extracto etanólico de *A. gratissima* var. *gratissima* podríamos indicar como posible mecanismo de acción del efecto antidepressivo, un conjunto de interacciones con otros receptores no estudiados por Zeni y colaboradores, para los cuales el método de suspensión de la cola no es lo suficientemente sensible (64,65).

En cuanto a *A. virgata* var. *platyphylla* se observó una disminución estadísticamente significativa en el tiempo de inmovilidad del grupo de animales que fue tratado por 7 días con 50 y 100 mg/kg ($p < 0,05$) en relación con el grupo que recibió vehículo, en el ensayo de suspensión de la cola. Los resultados obtenidos al evaluar la actividad antidepressiva por medio del ensayo de natación forzada demostraron que tanto en el modelo de administración múltiple en 24 horas, como en el tratamiento por 7 días con el extracto etanólico de *Aloysia virgata* var. *platyphylla* hay disminución en el tiempo de inmovilidad en los animales, comparando con el grupo vehículo.

Al igual que con *A. gratissima* var. *gratissima*, en la conducta de escape (climbing) en el ensayo de natación forzada, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de animales tratados con vehículo, imipramina ni los grupos de animales tratados con las diferentes dosis testadas de *A. virgata* var. *platyphylla* y sí se observó un aumento estadísticamente significativo en el tiempo de conducta de nado (swimming) lo cual podría indicar que este extracto demuestra actividad antidepressiva sin manifestar efecto estimulante sobre el SNC, por un mecanismo de acción similar a la imipramina, tal como se describió previamente.

En evaluación previa de la actividad antidepresiva de otra Verbenaceae, *Aloysia polystachya*, se demostró que tanto la administración aguda, como la de 7 días disminuye el tiempo de inmovilidad en el ensayo de natación forzada en ratones. Al igual que en este trabajo de investigación, la administración por 7 días resultó en un mayor porcentaje de reducción de la inmovilidad (24).

Una ventaja del ensayo de natación forzada es que al realizar modificaciones como incrementar la profundidad del agua en el cilindro, permite distinguir tres tipos de comportamientos en los animales: conducta de inmovilidad, conducta de escape y conducta de nado, tal como se describió en el apartado metodología.

Una ventaja de diferenciar los tipos de comportamientos en los animales es la posibilidad de diferenciar el efecto estimulante del SNC del efecto antidepresivo y orientar acerca del mecanismo de acción, ya que aquellos fármacos antidepresivos cuyo mecanismo de acción involucra la inhibición no selectiva de la recaptación de la serotonina y norepinefrina disminuyen el tiempo en que los animales manifiestan la conducta de inmovilidad, e incrementan el tiempo en que los animales manifiestan la conducta de nado sin modificar la conducta de escape (58, 59). Si bien la evaluación inicial de estas conductas se llevó a cabo en ratas, es válida la evaluación de estos comportamientos en ratones, en los que demostró su utilidad ya que al cuantificar esta conducta en esta especie es posible encontrar una diferencia estadísticamente significativa en estas conductas y por tanto orientar la acción del fármaco sobre el sistema nervioso central (58, 59, 62).

No se reportaron estudios previos sobre la actividad antidepresiva del extracto de *A. virgata* var. *platyphylla*. Sin embargo, previamente se ha estudiado la acción sobre el sistema nervioso central de dos diterpenos aislados de esta planta. Uno de ellos demostró efecto ansiolítico, además se reportó que esto podría deberse a su afinidad moderada al sitio de unión de las benzodiazepinas al receptor GABA_A (28). Fármacos ansiolíticos como el diazepam, ejercen su efecto mediante este mecanismo y con este fármaco se describió previamente que el tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión de la cola se incrementa (28, 64, 65). Una teoría actual acerca de una de las causas de los síntomas de la depresión postula la disminución del ácido gama-aminobutírico en la corteza occipital y prefrontal en estudios de espectroscopía de resonancia magnética en pacientes que cursan con depresión aguda en conjunto con la teoría de la disminución en la liberación de monoaminas en el espacio sináptico (40). Por esto, la interacción con el sitio de unión de las benzodiazepinas en el receptor GABA_A podría explicar uno de los

mecanismos por el cual es posible observar esta disminución en el tiempo de inmovilidad en los animales tratados con las distintas dosis de *A. virgata* var. *plathyphylla*.

Se requieren estudios adicionales que identifiquen la composición fitoquímica y el mecanismo por el cual ejerce su efecto antidepresivo, de cada uno de los extractos empleados en este trabajo a fin de concluir al respecto.

7 CONCLUSIÓN

Se evaluó la actividad antidepresiva de los extractos etanólicos de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* por medio de los ensayos suspensión de la cola y natación forzada, en animales tratados con dosis múltiples en 24 horas y por 7 días. Se determinó que ambos extractos disminuyeron el tiempo de inmovilidad de los ratones tratados en el ensayo de natación forzada, en las dos modalidades de tratamiento.

Se concluyó que los extractos etanólicos de *A. gratissima* var. *gratissima* y *A. virgata* var. *platyphylla* demostraron efecto antidepresivo en el ensayo de natación forzada, en las dosis ensayadas, luego de los tratamientos en 24 horas y por siete días.

Para ambos extractos, *A. gratissima* var. *gratissima* y *A. virgata* var. *platyphylla*, los porcentajes de reducción de la inmovilidad en el ensayo natación forzada son similares a la imipramina, ya que resultaron altamente significativos.

Los resultados indican que la reducción del tiempo de inmovilidad es aún mayor mayor en *A. virgata* var. *platyphylla* que en el extracto de *A. gratissima* var. *gratissima*, en ambas modalidades de tratamiento. Luego del tratamiento por 7 días se observó una disminución mayor que con el tratamiento de tres dosis en 24 horas. Esto indica una mayor potencia antidepresiva del extracto de *A. virgata* var. *platyphylla*.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferrari AJ, Charlson FJ, Norman RE, Patten SB, Freedman G, Murray CJL, et al. Burden of Depressive Disorders by Country, Sex, Age, and Year: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *PLoS Med.* 2013;10(11).
2. Ustun TB, Gater R. Integrating mental health into primary care. *Curr Opin Psychiatry* 7(2)(pp 173-180),1994;(2):173–80.
3. Health Protection Agency. Health Protection in the 21st Century. Chief Exec [Internet]. 2005; Available from: www.hpa.org.uk/publications
4. Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, Baxter AJ, Ferrari AJ, Erskine HE, et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2013;382(9904):1575–86.
5. Organización Mundial de la Salud. The Global Health Observatory. Estimated population-based prevalence of depression [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud;2021 [citado 2021 may 10] Disponible en: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-population-based-prevalence-of-depression>
6. Santos IS, Tavares BF, Munhoz TN, de Almeida LSP, da Silva NTB, Tams BD, et al. Sensitivity and specificity of the Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) among adults from the general population | Sensibilidade e especificidade do Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) entre adultos da população geral. *Cad Saude Publica.* 2013;29(8):1533–43.
7. Daskalopoulou M, George J, Walters K, Osborn DP, Batty GD, Stogiannis D, et al. Depression as a risk factor for the initial presentation of twelve cardiac,

- cerebrovascular, and peripheral arterial diseases: Data linkage study of 1.9 million women and men. *PLoS One*. 2016;11(4):1–16.
8. Katon W, Lin EHB, Kroenke K. The association of depression and anxiety with medical symptom burden in patients with chronic medical illness. *Gen Hosp Psychiatry*. 2007; 29(2):147–55.
 9. Ströhle A. Physical activity, exercise, depression and anxiety disorders. *J Neural Transm*. 2009; 116(6):777–84.
 10. Hamer M, Stamatakis E, Mishra GD. Television- and Screen-Based Activity and Mental Well-Being in Adults. *Am J Prev Med*. 2010;38(4):375–80.
 11. Boden JM, Fergusson DM. Alcohol and depression. *Addiction*. 2011;106(5):906–14.
 12. Gigantesco A, Ferrante G, Baldissera S, Masocco M, Minardi V, Possenti V, et al. Depressive symptoms and behavior-related risk factors, Italian population-based surveillance system, 2013. *Prev Chronic Dis*. 2015;12(10):1–12.
 13. Mimi T, Hibbert M, Bowes G. Depression and Smoking Initiation. 1998;88(10).
 14. Rienks J, Dobson AJ, Mishra GD. Mediterranean dietary pattern and prevalence and incidence of depressive symptoms in mid-aged women: Results from a large community-based prospective study. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67(1):75–82.
 15. Garlet TMB, Irgang BE. Medicinal plants used by rural women workers in Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brazil [Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil]. *Rev Bras Plantas Med*. 2001;4(1):9–18.
 16. De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A, Pornpakakul S, Liangsakul J, et al. Two new cembranoids from *Croton oblongifolius*. *J Nat Prod*. 2002;1(4):11–33.
 17. de Rezende HA, Monteiro Cocco MI. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Rev Esc Enferm USP*. 2002;36(3):282–8.
 18. Cavalcante E Costa GF, Nishijo H, Caixeta LF, Aversi-Ferreira TA. The confrontation between ethnopharmacology and pharmacological tests of medicinal plants associated with mental and neurological disorders. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2018;2018.
 19. Vale NB do. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? *Rev Bras Anesthesiol*. 2002;52(3):368–80.
 20. de França IS, de Souza JA, Baptista RS, Britto VR. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Rev Bras Enferm*. 2008; 61(2):201–8.

21. Soares NP, Camilo Neves A, de Abreu T, de Abreu Pfrimer G, Nishijo H, Aversi-Ferreira TA. Plantas medicinais utilizadas pela população de goianópolis, estado de goiás, Brasil. *Acta Sci - Biol Sci.* 2013;35(2):263–71.
22. Gómez-Estrada H, Díaz-Castillo F, Franco-Ospina L, Mercado-Camargo J, Guzmán-Ledezma J, Medina JD, et al. Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2011;7(1):27.
23. Costa de Melo N, Sánchez-Ortiz BL, dos Santos Sampaio TI, Matias Pereira AC, Pinheiro da Silva Neto FL, Ribeiro da Silva H, et al. Anxiolytic and Antidepressant Effects of the Hydroethanolic Extract from the Leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke: A Study on Zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmaceuticals.* 2019;12(3):106.
24. Hellióñ-Ibarrola M.C, Ibarrola DA, Montalbetti Y, et al. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachya* (griseb.) Moldenke (verbenaceae) in mice. *Phytomedicine.* 2008;15(6):478-483.
25. Kennedy ML, Taboada T, Snead E, Diarte EMG, Coronel CM, Arrua W, Heinechen O, Montalbetti Y, Hellion-Ibarrola MC, Ibarrola DA, Campuzano-Bublitz MA. Evaluation of methanol extract of *Aloysia gratissima* var. *gratissima* leaves on behavior and anxiety in mice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2021; 12.
26. Snead E. Evaluacion de la actividad ansiolitica de *Aloysia virgata* var. *platiphylla* y *Aloysia gratissima* var. *gratissima* en ratones [Trabajo de grado para optar al titulo de Quimico Farmaceutico]. San Lorenzo; Universidad Nacional de Asunción; 2018.
27. Zeni A., Zomkowski A., Maraschin M., Tasca C., Rodrigues S. Evidence of the involvement of the monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Aloysia gratissima*, *Journal of Ethnopharmacology* 2013, 148: 914-920.
28. Wasowski C, Marder M. Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*. *Phytomedicine.* 2011;18(5):393–401.
29. Organizacion Mundial de la Salud. Depression and other mental health disorders: Global Health Estimates. Ginebra: Organizacion Mundial de la Salud; 2017. *Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.*
30. Riemann D, Berger M, Voderholzer U. Sleep and depression - Results from psychobiological studies: An overview. *Biol Psychol.* 2001;57(1–3):67–103.
31. Alexopoulos GS. Depression in the elderly. *Lancet.* 2005;365(9475):1961–70.

32. Alexopoulos GS, Buckwalter K, Olin J, Martinez R, Wainscott C, Krishnan KRR. Comorbidity of late life depression: An opportunity for research on mechanisms and treatment. *Biol Psychiatry*. 2002;52(6):543–58.
33. Stunkard AJ, Faith MS, Allison KC. Depression and obesity. *Biol Psychiatry*. 2003;54(3):330–7.
34. Pine DS, Goldstein RB, Wolk S, Weissman MM. The association between childhood depression and adulthood body mass index. *Pediatrics*. 2001;107(5):1049–56.
35. Takenaka H. Postpartum depression. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*. 2003;287(38):318–21.
36. Josefsson A, Berg G, Nordin C, Sydsjö G. Prevalence of depressive symptoms in late pregnancy and postpartum. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001;80(3):251.
37. Torta R, Pennazio F, Ieraci V. Anxiety and depression in rheumatologic diseases: The relevance of diagnosis and management. *Reumatismo*. 2014;66(1):92–7.
38. Gigantesco A, Ferrante G, Baldissera S, Masocco M, Minardi V, Possenti V, et al. Depressive symptoms and behavior-related risk factors, Italian population-based surveillance system, 2013. *Prev Chronic Dis*. 2015;12(10):1–12.
39. Hasler G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest of clinicians. *World Psychiatry*. 2010; 9:155-161.
40. Bondy B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2002; 4:7-20.
41. Ferguson JM. SSRI antidepressant medications: Adverse effects and tolerability. Vol. 3, Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry. 2001. p. 22–7.
42. Sarris J, Panossian A, Schweitzer I, Stough C, Scholey A. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011;21(12):841–60.
43. Hellión-Ibarrola MC, Montalbetti Y, Heinichen OY, Kennedy ML, Campuzano MA, Alvarenga N, et al. Antidepressant-like effect of *Kyllinga brevifolia* rhizomes in male mice and chemical characterization of the components of the active ethyl acetate fraction. *J Ethnopharmacol*. 2016;194(October):1005–11.
44. Parente MSR, Custódio FR, Cardoso NA, Lima MJA, De Melo TS, Linhares MI, et al. Antidepressant-like effect of *Lippia sidoides* CHAM (Verbenaceae) essential oil and its major compound thymol in mice. *Sci Pharm*. 2018;86(3):1–19.

45. Barrios I, Miltos V, Piris A, Piris G, Centurión C. Efecto Antidepresivo del Extracto Hidroalcohólico de *Aloysia citradora*. 2016;14(1):9–12.
46. Lira PDL, Van Baren CM, Retta D, Bandoni AL, Gil A, Gattuso M, et al. Characterization of *Lemon verbena* (*Aloysia citradora* palau) from argentina by the essential oil. *J Essent Oil Res*. 2008;20(4):350–3.
47. Benites J, Bustos L, Rios D, Bravo F, López J, Gajardo S, et al. Antidepressant and anxiolytic-like effects of essential oil from *Acantholippia deserticola* Phil in female rats | Efecto ansiolítico y antidepresivo del aceite esencial de *Acantholippia deserticola* phil en ratas hembras. *Bol Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromat*. 2013;12(4).
48. Bekara A, Amazouz A, Douma TB. Evaluating the antidepressant effect of *Verbena officinalis* L. (Vervain) aqueous extract in adult rats. *Basic Clin Neurosci*. 2020;11(1):91–8.
49. Hamann FR, Zago AM, Rossato MF, Beck VR, Mello CF, de Brum TF, et al. Antinociceptive and antidepressant-like effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats. *J Ethnopharmacol*. 2016;192:210–6.
50. Mora S, Díaz-Véliz G, Millán R, Lungenstrass H, Quirós S, Coto-Morales T, et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;82(2):373–8.
51. da Silva CC, Vandresen F, de Oliveira CMA, Kato L, Tanaka CMA, Ferreira HD. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). *Biochem Syst Ecol*. 2006;34(7):593–5.
52. Zeni ALB, De Albuquerque CAC, Gonçalves F, Latini A, Tasca CI, Podestá R, et al. Phytochemical profile, toxicity and antioxidant activity of *Aloysia gratissima* (Verbenaceae). *Quim Nova*. 2013;36(1):69–73.
53. Vandresen F, Schmitt E, Kato L, Oliveira CMA de, Amado CAB, Silva CC da. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. *Rev Bras Farmacogn*. 2010;20(3):317–21.
54. Zeni ALB, Zomkowski ADE, Dal-Cim T, Maraschin M, Rodrigues ALS, Tasca CI. Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(1):864–74.

55. De Oliveira CMA, Da Silva CC, Ferreira HD, De Fátima Lemes G, Schmitt E. Kauranes, phenylethanoids and flavone from *Aloysia virgata*. *Biochem Syst Ecol*. 2005;33(11):1191–3.
56. Ricciardi GAL, Torres AM, van Baren C, Lira PDL, Ricciardi AIA, Dellacassa E, et al. Essential oil of *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Briquet) Moldenke from Corrientes (Argentina). *Flavour Fragr J*. 2005;20(6):645–9.
57. Métodos de Evaluación de la Actividad Farmacológica de Plantas Medicinales. CYTED/CNPq 2002, 72-86.
58. Costa APR, Vieira C, Bohner LOL, Silva CF, Santos EC da S, De Lima TCM, et al. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2013;45:150–5.
59. Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp*. 2015;2015(97):1–7.
60. Real Decreto 13744, 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales de experimentación y otros fines científicos, Ministerio de la Presidencia- España, BOE 252, 34367-34391 (2005).
61. Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The tail suspension test. *J Vis Exp*. 2012;(59):1–5.
62. Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002;23(5):238–45.
63. Moroni P, O’Leary N, Filloy J. Species delimitation in the *Aloysia gratissima* complex (Verbenaceae) following the phylogenetic species concept. *Bot J Linn Soc*. 2016;180(2):193–212.
64. Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4–5):571–625.
65. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367–70.

ANEXOS

Análisis Estadístico de los Resultados Obtenidos

Tabla 1- Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tres dosis en 24 horas con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* en el ensayo de suspensión de la cola.

Number of families	1							
Number of comparisons per family	5							
Alpha	0,05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant ?	Summary	A-?			
vehículo vs. im. 32 mg/kg	71,14	43,43 to 98,86	Yes	****	B	im, 32 mg/kg		
vehículo vs. A. g. 50 mg/kg	5,286	-22,43 to 33	No	ns	C	A, g, 50 mg/kg		
vehículo vs. A. g. 100 mg/kg	-6,571	-34,29 to 21,15	No	ns	D	A, g, 100 mg/kg		
vehículo vs. A. g. 200 mg/kg	-22,29	-50 to 5,431	No	ns	E	A, g, 200 mg/kg		
vehículo vs. A. g. 400 mg/kg	3,714	-24 to 31,43	No	ns	F	A, g, 400 mg/kg		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	D F
vehículo vs. im. 32 mg/kg	117	45,86	71,14	10,43	7	7	6,82	30
vehículo vs. A. g. 50 mg/kg	117	111,7	5,286	10,43	7	7	0,5067	30
vehículo vs. A. g. 100 mg/kg	117	123,6	-6,571	10,43	7	7	0,63	30
vehículo vs. A. g. 200 mg/kg	117	139,3	-22,29	10,43	7	7	2,136	30
vehículo vs. A. g. 400 mg/kg	117	113,3	3,714	10,43	7	7	0,3561	30

Tabla 2- Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tratamiento por 7 días con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* en el ensayo de suspensión de la cola.

Number of families	1								
Number of comparisons per family	5								
Alpha	0,05								
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary		A-?			
Vehiculo vs. Imp. 32 mg/kg	101,5	64,57 to 138,4	Yes	****		B	Imp, 32 mg/kg		
Vehiculo vs. A.g. 50mg/kg	54,17	17,23 to 91,1	Yes	**		C	A,g, 50mg/kg		
Vehiculo vs. A.g. 100 mg/kg	36,83	-0,1014 to 73,77	No	ns		D	A,g, 100 mg/kg		
Vehiculo vs. A.g. 200 mg/kg	35,17	-1,768 to 72,1	No	ns		E	A,g, 200 mg/kg		
Vehiculo vs. A.g. 400 mg/kg	35,67	-1,268 to 72,6	No	ns		F	A,g, 400 mg/kg		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF	
Vehiculo vs. Imp. 32 mg/kg	134,2	32,67	101,5	13,74	6	6	7,386	25	
Vehiculo vs. A.g. 50mg/kg	134,2	80	54,17	13,74	6	6	3,942	25	
Vehiculo vs. A.g. 100 mg/kg	134,2	97,33	36,83	13,74	6	6	2,68	25	
Vehiculo vs. A.g. 200 mg/kg	134,2	99	35,17	13,74	6	6	2,559	25	
Vehiculo vs. A.g. 400 mg/kg	134,2	98,5	35,67	13,74	6	6	2,595	25	

Tabla 3- Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tres dosis en 24 horas con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* en el ensayo de Natación Forzada

Number of families	1							
Number of comparisons per family	5							
Alpha	0,05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant ?	Summary	A-?			
vehículo vs. im. 32 mg/kg	84,17	33,53 to 134,8	Yes	***	B	im, 32 mg/kg		
vehículo vs. A. g. 50 mg/kg	32,67	-17,97 to 83,3	No	ns	C	A, g, 50 mg/kg		
vehículo vs. A. g. 100 mg/kg	48,67	-1,971 to 99,3	No	ns	D	A, g, 100 mg/kg		
vehículo vs. A. g. 200 mg/kg	60,67	10,03 to 111,3	Yes	*	E	A, g, 200 mg/kg		
vehículo vs. A. g. 400 mg/kg	42,17	-8,471 to 92,8	No	ns	F	A, g, 400 mg/kg		
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	D F
vehículo vs. im. 32 mg/kg	118,8	34,67	84,17	18,84	6	6	4,467	25
vehículo vs. A. g. 50 mg/kg	118,8	86,17	32,67	18,84	6	6	1,734	25
vehículo vs. A. g. 100 mg/kg	118,8	70,17	48,67	18,84	6	6	2,583	25
vehículo vs. A. g. 200 mg/kg	118,8	58,17	60,67	18,84	6	6	3,22	25
vehículo vs. A. g. 400 mg/kg	118,8	76,67	42,17	18,84	6	6	2,238	25

Tabla 4- Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tratamiento por 7 días con *Aloysia gratissima* var. *gratissima* en el ensayo de Natación Forzada

Number of families	1							
Number of comparisons per family	5							
Alpha	0,05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant ?	Summary		A-?		
Vehiculo vs. Imp. 32 mg/kg	138,8	105,1 to 172,6	Yes	****		B	Imp, 32 mg/kg	
Vehiculo vs. A.v. 50mg/kg	157,2	123,4 to 190,9	Yes	****		C	A,v, 50mg/kg	
Vehiculo vs. A.v. 100 mg/kg	155,5	121,8 to 189,2	Yes	****		D	A,v, 100 mg/kg	
Vehiculo vs. A.v. 200 mg/kg	149,3	115,6 to 183,1	Yes	****		E	A,v, 200 mg/kg	
Vehiculo vs. A.v. 400 mg/kg	173,2	139,4 to 206,9	Yes	****		F	A,v, 400 mg/kg	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
Vehiculo vs. Imp. 32 mg/kg	179,3	40,5	138,8	12,56	6	6	11,06	25
Vehiculo vs. A.v. 50mg/kg	179,3	22,17	157,2	12,56	6	6	12,52	25
Vehiculo vs. A.v. 100 mg/kg	179,3	23,83	155,5	12,56	6	6	12,38	25
Vehiculo vs. A.v. 200 mg/kg	179,3	30	149,3	12,56	6	6	11,89	25
Vehiculo vs. A.v. 400 mg/kg	179,3	6,167	173,2	12,56	6	6	13,79	25

Tabla 5- Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tres dosis en 24 horas con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en el ensayo de suspensión de la cola.

Number of families	1							
Number of comparisons per family	5							
Alpha	0,05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary		A-?		
vehiculo vs. im. 32 mg/kg	73,33	46,67 to 100	Yes	****		B	im, 32 mg/kg	
vehiculo vs. A. v. 50 mg/kg	22,83	-3,831 to 49,5	No	ns		C	A, v, 50 mg/kg	
vehiculo vs. A. v. 100 mg/kg	-15,67	-42,33 to 11	No	ns		D	A, v, 100 mg/kg	
vehiculo vs. A. v. 200 mg/kg	-31	-57,66 to -4,336	Yes	*		E	A, v, 200 mg/kg	
vehiculo vs. A. v. 400 mg/kg	-16,67	-43,33 to 9,998	No	ns		F	A, v, 400 mg/kg	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
vehiculo vs. im. 32 mg/kg	113,8	40,5	73,33	10,04	6	6	7,307	30
vehiculo vs. A. v. 50 mg/kg	113,8	91	22,83	10,04	6	6	2,275	30
vehiculo vs. A. v. 100 mg/kg	113,8	129,5	-15,67	10,04	6	6	1,561	30
vehiculo vs. A. v. 200 mg/kg	113,8	144,8	-31	10,04	6	6	3,089	30
vehiculo vs. A. v. 400 mg/kg	113,8	130,5	-16,67	10,04	6	6	1,661	30

Tabla 6- Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tratamiento por 7 días con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en el ensayo de suspensión de la cola.

Number of families	1							
Number of comparisons per family	5							
Alpha	0,05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?		
Vehiculo vs. Imp. 32 mg/kg	101,5	56.85 to 146.2	Yes	****	<0.0001	B	Imp. 32 mg/kg	
Vehiculo vs. A.v. 50mg/kg	49,83	5.181 to 94.49	Yes	*	0,0245	C	A.v. 50mg/kg	
Vehiculo vs. A.v. 100 mg/kg	50,67	6.014 to 95.32	Yes	*	0,0218	D	A.v. 100 mg/kg	
Vehiculo vs. A.v. 200 mg/kg	38	-6.653 to 82.65	No	ns	0,1162	E	A.v. 200 mg/kg	
Vehiculo vs. A.v. 400 mg/kg	41,5	-3.153 to 86.15	No	ns	0,0754	F	A.v. 400 mg/kg	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
Vehiculo vs. Im. 32 mg/kg	134,2	32,67	101,5	16,81	6	6	6,04	30
Vehiculo vs. A.v. 50mg/kg	134,2	84,33	49,83	16,81	6	6	2,965	30
Vehiculo vs. A.v. 100 mg/kg	134,2	83,5	50,67	16,81	6	6	3,015	30
Vehiculo vs. A.v. 200 mg/kg	134,2	96,17	38	16,81	6	6	2,261	30
Vehiculo vs. A.v. 400 mg/kg	134,2	92,67	41,5	16,81	6	6	2,469	30

Tabla 7. Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tratamiento tres dosis en 24 horas con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en el ensayo de Natación Forzada

Number of families	1							
Number of comparisons per family	5							
Alpha	0,05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant ?	Summary		A-?		
vehículo vs. im. 32 mg/kg	77,17	38,44 to 115,9	Yes	****		B	im, 32 mg/kg	
vehículo vs. A. v. 50 mg/kg	63,17	24,44 to 101,9	Yes	***		C	A, v, 50 mg/kg	
vehículo vs. A. v. 100 mg/kg	54,83	16,1 to 93,56	Yes	**		D	A, v, 100 mg/kg	
vehículo vs. A. v. 200 mg/kg	65	26,27 to 103,7	Yes	***		E	A, v, 200 mg/kg	
vehículo vs. A. v. 400 mg/kg	57,83	19,1 to 96,56	Yes	**		F	A, v, 400 mg/kg	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
vehículo vs. im. 32 mg/kg	108,5	31,33	77,17	14,41	6	6	5,355	25
vehículo vs. A. v. 50 mg/kg	108,5	45,33	63,17	14,41	6	6	4,384	25
vehículo vs. A. v. 100 mg/kg	108,5	53,67	54,83	14,41	6	6	3,805	25
vehículo vs. A. v. 200 mg/kg	108,5	43,5	65	14,41	6	6	4,511	25
vehículo vs. A. v. 400 mg/kg	108,5	50,67	57,83	14,41	6	6	4,013	25

Tabla 8- Análisis estadístico de los resultados obtenidos con los animales que recibieron tratamiento por 7 días con *Aloysia virgata* var. *platyphylla* en el ensayo de Natación Forzada

Number of families	1							
Number of comparisons per family	5							
Alpha	0,05							
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary		A-?		
Vehiculo vs. Imp. 32 mg/kg	138,8	96,64 to 181	Yes	****		B	Imp, 32 mg/kg	
Vehiculo vs. A.g. 50mg/kg	122,3	80,14 to 164,5	Yes	****		C	A,g, 50mg/kg	
Vehiculo vs. A.g. 100 mg/kg	119	76,8 to 161,2	Yes	****		D	A,g, 100 mg/kg	
Vehiculo vs. A.g. 200 mg/kg	135,2	92,97 to 177,4	Yes	****		E	A,g, 200 mg/kg	
Vehiculo vs. A.g. 400 mg/kg	129,8	87,64 to 172	Yes	****		F	A,g, 400 mg/kg	
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	g	DF
Vehiculo vs. Imp. 32 mg/kg	179,3	40,5	138,8	15,88	6	6	8,742	30
Vehiculo vs. A.g. 50mg/kg	179,3	57	122,3	15,88	6	6	7,703	30
Vehiculo vs. A.g. 100 mg/kg	179,3	60,33	119	15,88	6	6	7,493	30
Vehiculo vs. A.g. 200 mg/kg	179,3	44,17	135,2	15,88	6	6	8,511	30
Vehiculo vs. A.g. 400 mg/kg	179,3	49,5	129,8	15,88	6	6	8,175	30