

Efecto Antidepresivo del Extracto Hidroalcohólico de *Aloysia citriodora* (Cedrón Paraguay) Usando Test de Suspensión de la Cola en Ratones Albinos Suizos

Antidepressant-like Effect of Hydroalcoholic Extract of *Aloysia citriodora* (Paraguayan Kedron) Using Tail Suspension Test in Swiss Albino Mice.

Iván Barrios¹, Verónica Miltos¹, Adriana Piris¹, Giselle Piris¹, Claudia Centurión²

Resumen

La depresión constituye uno de los problemas de salud más frecuentes e incapacitantes. Se debe diferenciar de la tristeza que es una respuesta humana universal a la frustración, desilusión u otras adversidades. La depresión afecta la vida afectiva, cognitiva, conductual y somática de la persona. La *Aloysia citriodora*, conocida en Paraguay como Cedrón Paraguay, es un arbusto aromático; se ha comprobado que tiene acciones antiespasmódicas, sedantes, antibacterianas, antigenotóxicas, antioxidantes. No se conoce el uso de Cedrón Paraguay como un antidepresivo, a pesar de que existen publicaciones en el país de textos sobre “Medicina naturópata” que afirman tener dicho efecto. Realizamos un estudio experimental, comparativo, en paralelo llevado a cabo en ratones albinos suizos adultos machos. Los animales tratados con *Aloysia citriodora* 600 mg/kg presentaron menor tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola con resultados cercanos. Concluimos entonces que el Cedrón Paraguay puede ser útil en el tratamiento para la depresión.

Palabras clave:

Depresión, *Aloysia citriodora*, Antidepresivo, Cedrón Paraguay

Abstract

Depression is one of the most frequent and disabling health problems. It should be distinguished from sadness which is a universal human response to frustration, disappointment or other adversities. Depression affects the emotional, cognitive, behavioral and somatic life of the person. The *Aloysia citriodora*, known as Paraguayan Kedron is an aromatic shrub; It has been shown to have antispasmodic, sedative, antibacterial, antigenotoxic and antioxidant actions. Paraguayan Kedron is not used as an antidepressant, although there are reports in the field of studies on “Naturopathic Medicine” that claim they have such an antidepressant-like effect. It is an experimental, comparative study carried out in parallel in adult male Swiss albino mice. Animals treated with *Aloysia citriodora* 600 mg / kg had lower immobility time in the tail suspension test with close result. We conclude that the Paraguayan Kedron may be useful for treating depression.

Keywords:

Depression, *Aloysia citriodora*, antidepressant, Cedrón Paraguay

INTRODUCCIÓN

La depresión constituye uno de los problemas de salud más frecuentes e incapacitantes, que se debe diferenciar de la tristeza que es una respuesta humana universal a la frustración, desilusión y otras adversidades. La depresión afecta la vida afectiva, cognitiva, conductual y somática de la persona¹.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) la depresión “es un trastorno mental frecuente, que se caracteriza por la presencia de tristeza, pérdida de interés o placer, sentimientos de culpa o falta de autoestima, trastornos del sueño o del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración” recordando que estos síntomas deben estar presentes al menos por 2 semanas para realizar un diagnóstico^{1,2}.

Dada la prevalencia de este trastorno se han estudiado varios fármacos para su tratamiento, a la vez se han estudiado tratamientos con fitoquímicos, en este punto es importante aclarar que varios de los fármacos aprobados para su uso en el tratamiento de la depresión muestran sus efectos luego de por lo menos 15 días de tratamientos y otras veces esos efectos son observados en tres a cuatro semanas luego de empezar el tratamiento³.

La *Aloysia citriodora*, conocida en Paraguay como Cedrón Paraguay, es un arbusto aromático. Se ha comprobado que tiene acciones antiespasmódicas, sedantes, antibacterianas, antigenotóxicas, antioxidantes y repelente de insectos⁴⁻⁶. La composición química de la *A. citriodora* está formada por monoterpenos y sesquiterpenos, flavonoides, compuesto fenólicos, taninos hidrolizables, irioides y trazas de alcaloides⁷.

¹ Estudiante universitario de Medicina y Cirugía. Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

² Doctora en Medicina y Cirugía. Especialista en Medicina Interna. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

Correspondencia a:

Iván Barrios
Estudiante fellow del Departamento de Neurociencias, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción.

E-Mail:

ibarrios@neurociencias.org.py

Recibido:

21 de enero de 2016

Acceptedo:

22 de agosto de 2016

scientific.umsa.bo

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la realización de este manuscrito.

Los principales componentes son: alfa pineno, limoneno, sabineno, citral, neral, etc.⁸⁻¹⁰. Hay evidencia de que los flavonoides presentes en extractos vegetales tienen efecto antidepressivo¹¹. En el caso particular de la *A. citriodora* tiene un flavonoide denominado hesperidina que pareciera estar relacionado con el sistema opioide produciendo un efecto antidepressivo en modelos animales^{12,13}.

Los polifenoles naturales que podemos encontrar en varios productos obtenidos de plantas demuestran tener varios efectos psicológicos y bioquímicos en el cuerpo útiles para el tratamiento de trastornos mentales, esto porque modulan la neurotransmisión de monoaminas en el cerebro lo cual produce el efecto antidepressivo en los modelos animales^{14,15}. Por todo lo mencionado, demostrar el posible efecto antidepressivo del extracto hidroalcohólico de *Aloysia citriodora* se ha convertido en el principal propósito de esta investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimental, comparativo, en paralelo. La población estuvo constituida por ratones albinos suizos adultos, procedentes del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de Asunción, machos, de peso entre 20 y 30 gramos. Los ratones utilizados no fueron modificados genéticamente para expresar genotipo o fenotipo depresivos.

Criterios de inclusión: Ratones sin patologías de base

Criterios de exclusión: Ratones que pesen menos de 20 g

El muestreo es de tipo probabilístico, aleatorio simple. Para el cálculo del tamaño de muestra se tuvieron en cuenta a partir de las indicaciones del "Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research of the National Academy of Sciences"¹³ norteamericana, la siguiente fórmula:

$$n=1+2C(s/d)2$$

Donde C es un coeficiente determinado por el error α y el error β , que en este estudio se tomó un α de 0,05 y una β de 10%, con lo que da una C de 10,51. La s de un estudio previo^{2,5} y la d esperada es de 7 segundos con lo que resulta un tamaño mínimo para cada grupo de 3,68 que, por necesidad de redondeo, se decide 4 animales por grupo, la muestra estuvo constituida por 16 animales. Al finalizar el estudio los ratones fueron sacrificados administrándoles por vía intraperitoneal una sobredosis del anestésico tiopental (dosis de 120 mg/kg). Se asignó aleatoriamente los 16 ratones a 4 grupos, a los cuales se les administró por sonda orogástrica: placebo, fluoxetina, extracto de *Aloysia citriodora* en diferentes dosis para medir si producen un efecto antidepressivo y en qué intensidad al comparar los 4 grupos. Un ratón murió en el transcurso de la experimentación por causas no relacionadas al proceso de investigación.

- **Grupo Control técnica** (n=3) Se les administró agua mineral (0,8 ml por cada 100 g de peso)

- **Grupo control droga** (n=4) Se les administró por sonda orogástrica, fluoxetina, 10 mg/kg (5 ml por cada 100 g de peso), para comparar el efecto de *Aloysia citriodora* con el de una droga de comprobada acción antidepressiva.

- **Grupo Experimental 1** (n=4) Se les administró por sonda orogástrica, extracto de *Aloysia citriodora* en una dosis de 400 mg/Kg (0,3 ml por cada 100 g de peso).

- **Grupo Experimental 2** (n=4) Se les administró por sonda orogástrica, extracto de *Aloysia citriodora* en una dosis de 600 mg/Kg (0,4ml por cada 100 g de peso).

El estudio se realizó en el bioterio de la cátedra de Fisiopatología, de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. Los ratones fueron alojados en jaulas, se les proveyó de balanceado y agua mineral ad libitum. La temperatura promedio a la que estuvieron expuestos en el bioterio fue de 21°C y tuvieron un ciclo de 12 horas luz/oscuridad que fue controlado por el investigador encargado del mantenimiento. Se tuvieron cinco días de aclimatación, una semana de intervención y dos días de realización de la prueba "test de suspensión de la cola" y posterior eutanasia.

Extracto hidroalcohólico

La planta fue recolectada del jardín de plantas medicinales de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Asunción. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Aloysia citriodora* fue provisto por el departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Asunción. El proceso de elaboración del extracto fue el siguiente: las hojas secas de *Aloysia citriodora* se maceraron con etanol más agua bidestilada luego se filtraron en reposo para la posterior decantación y roto-evaporización, se liofilizó y se conservó el extracto.

Test de Suspensión de la cola

Este protocolo describe un procedimiento en ratones que es conceptualmente relacionado al test de nado forzado, donde la inmovilidad se induce simplemente suspendiendo el animal por la cola. Un ratón inicialmente tratará de escapar de la suspensión de la cola mediante la realización de movimientos vigorosos y luego, al cabo de unos minutos, se queda inmóvil. Al igual que la prueba de natación forzada, la inmovilidad se reduce con una amplia variedad de antidepressivos.

Se coloca a los animales en la sala experimental 60 minutos antes de comenzar el experimento, y de inmediato se coloca una marca de identificación en la cola de cada animal con tinta indeleble. Se retira el alimento y el agua durante la prueba.

Se envuelve con cinta adhesiva alrededor de la cola del animal en una posición constante, tres cuartas partes de la distancia desde la base de la cola. Debe suspenderse a los animales por la cola pasando el gancho de suspensión a través de la cinta adhesiva lo más cerca posible a la cola (de 1 a 2 mm) para asegurar que el animal se cuelgue con su cola en una línea recta (para evitar lesiones). La observación de los animales debe ser de forma continua durante 6 minutos.

Este experimento se realizó en un módulo de 20x25x30 cm, con la cabeza del animal suspendida a 5 cm de la base. La experiencia se realizó en una habitación con mínimo ruido que pudiera estresar al animal. La duración de la inmovilidad se observó durante los últimos 4 minutos, cuando menor sea el tiempo de inmovilidad en los ratones estudiados, mayor será el efecto antidepressivo^{16,17}.

Variables y mediciones

- Variable independiente: Extracto hidroalcohólico de hojas de *Aloysia citriodora* provisto por el Departamento de Fitoquímica, de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Asunción.

- Variable dependiente: Efecto antidepressivo.

- Tiempo de la inmovilidad (Cuantitativa nominal): Tiempo en que el ratón queda sin realizar ningún movimiento de escape, se permiten los movimientos que no se consideren como "intento de escape". Esto se interpreta como "desesperanza aprendida".

Se realizó la prueba de suspensión de la cola con cada ratón de los cuatro grupos según lo indicado. Las pruebas fueron grabadas con una cámara filmadora y luego se utilizó un programa gratuito de conversión lo cual permitió analizar el video en el programa Ethowatcher®. Los datos numéricos (tiempo en segundos) obtenidos a través del programa Ethowatcher® fueron procesados utilizando el programa estadístico Epi Info. Para cada una de las variables se midieron la media, la desviación típica y la prueba T de Student para comparar las medias de grupos. Se considerará una significancia de $p < 0,05$.

Consideraciones éticas

Para la presente investigación se respetaron los principios éticos en cuanto a los animales de experimentación, a) Brindar los cuidados adecuados a los animales; b) Evitar el dolor innecesario, sufrimiento, estrés o lesiones prolongadas; c) Evitar la duplicación o repetición innecesaria de experimentos; d) Reducir al mínimo indispensable el número de animales para garantizar la validez del estudio a realizar.

Así mismo se respetaron los delineamientos propuestos en principios éticos universales para el uso y cuidado de animales del Consejo Internacional de Organizaciones Médicas, así como los parámetros del Canadian Council on Animal Care para el manejo de los animales durante el experimento^{18, 19}.

RESULTADOS

La prueba tuvo una duración de 4 minutos (240 segundos) para cada ratón. La **Tabla 1** muestra los resultados del análisis descriptivo de la latencia de inmovilidad y tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola para los grupos de estudio.

Variables	Control	Fluoxetina	Experimental 1	Experimental 2
Latencia de Inmovilidad (segundos)	17,980 ± 12,435	65,462 ± 66,285	60,393 ± 29,322	50,877 ± 36,33
Tiempo de inmovilidad	78,643 ± 29,722	36,684 ± 63,479*	59,074 ± 8,242 (p=0,06)	48,304 ± 71,516* (p=0,04)

*Las diferencias entre las medias, en relación con el grupo control es significativa al nivel de $p < 0,05$.

En relación al grupo control y al grupo experimental 1 (*Aloysia citriodora* 400 mg/kg) los animales no mostraron diferencias en el tiempo de inmovilidad estadísticamente significativa; en contraste a los animales tratados con fluoxetina 10 mg/kg y Experimental 2 (*Aloysia citriodora* 600 mg/kg) quienes presentaron menor tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola con resultados cercanos.

El grupo Experimental 2 (*Aloysia citriodora* 400 mg/kg) disminuyó el tiempo de inmovilidad en un 38,5% con relación al grupo control.

En la **Figura 1** podemos ver un gráfico de caja y bigote con los datos del tiempo de latencia de inmovilidad de los ratones estudiados en los cuales podemos observar los valores extremos y la mediana.

DISCUSIÓN

La prueba de suspensión de la cola es una prueba que produce estrés en los ratones ya que crea una situación en la cual el animal no puede escapar. Además, produce desesperanza al no poder el animal escapar

de la situación. Esta prueba tiene mayor sensibilidad que la prueba de natación forzada y es eficaz para evaluar antidepresivos serotoninérgicos. Durante la prueba se crea una hipoactividad generalizada debido a la incapacidad de mantener el esfuerzo de intento de escape, algo análogo al daño psicomotriz en los pacientes con depresión²⁰⁻²³.

Los resultados que encontramos en este trabajo sugieren que los ratones tratados con *Aloysia citriodora* 600 mg/kg presenta un menor tiempo de inmovilidad en 38,5% ($p=0,04$) en relación con el grupo control, estos resultados fueron similares a los encontrados en el grupo que fue tratado con fluoxetina, sin embargo en este punto es necesario aclarar que estos ratones no fueron modificados genéticamente teniendo en cuenta las bases genéticas de la depresión, por lo que se convierte en una limitación de nuestro estudio¹.

Basándonos en los resultados obtenidos en la prueba de suspensión de la cola, podemos afirmar que las hojas de *Aloysia citriodora* podría presentar actividad antidepresiva; el mecanismo de acción probablemente, según la literatura, por su actividad neuronal serotoninérgica²⁴.

Estos resultados pueden justificar el uso tradicional de *Aloysia citriodora* para el tratamiento de ansiedad, depresión y otros trastornos mentales. Por lo cual creemos importante seguir realizando estudios sobre el extracto de esta planta ya que falta determinar si existen ciertos componentes o dosis que pueden llegar a ser tóxicas, así como determinar específicamente cuál de los componentes es el responsable del efecto encontrado en nuestra investigación.

Parte del posible efecto antidepresivo que hemos encontrado en la presente investigación puede explicarse por la presencia de polifenoles, los cuales fueron descritos en la introducción, sabemos que la cantidad total de fenoles en *Aloysia citriodora* es de 67,1 mg de ácido gálico por gramo²⁵.

Además del efecto antidepresivo encontrado, sabemos que *A. citriodora* exhibe un leve efecto hipotensor, inotropismo negativo y un importante efecto sedante de tipo benzodiazepina, por lo cual recomendamos realizar estudios adicionales para determinar la eficiencia de la planta como antidepresivo y como ansiolítico²⁶.

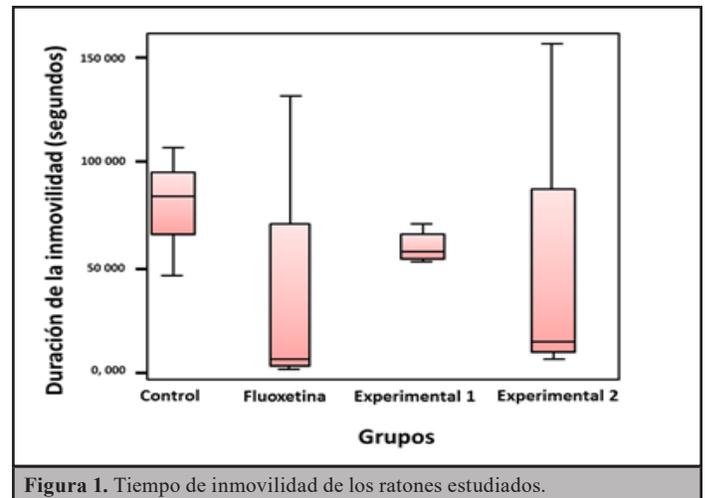


Figura 1. Tiempo de inmovilidad de los ratones estudiados.

CONCLUSIONES

Contrastados con el grupo control encontramos posibles efectos antidepresivos con el uso del extracto hidroalcohólico de *Aloysia citriodora* a una dosis de 600 mg/kg. Podemos concluir que *Aloysia citriodora* puede

tener efectos beneficiosos para el tratamiento de la depresión, sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar su efecto y saber qué componentes de la misma son los que pueden explicar este efecto.

Agradecimientos:

Cátedra de Fisiopatología de la Universidad Nacional de Asunción por los recursos humanos e infraestructura que nos brindaron.

A la International Brain Research Organization por el financiamiento a nuestra investigación.

Trabajo presentado en la Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Asunción

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arce A, Torales J, Riego V, Rodríguez J. Trastornos del Estado de Ánimo. En: Arce Ramírez A, Torales Benítez J. El Libro Azul de la Psiquiatría. 1ª ed. EFACIM. Asunción, 2012: 129 – 148.
2. Organización Mundial de la Salud [en línea] Disponible en: <http://www.who.int/topics/depression/es/>
3. Torales J, Arce A, Zacarías M. Depresión. En: Torales J, Arce A, Zacarías M. La guía TAZ de psicofarmacología clínica. 1a ed. EFACIM. Asunción, 2014:23-52
4. Ragone M, Sella M, Conforti P, Volonté M, Consolini A. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenums. *Jour ethnopharmacol*, 2007;113(2):258-266.
5. Gillij Y, Gleiser R, Zygadlo J. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource technology*, 2008;99(7):2507-2515
6. Vaquero M, Serravalle L, De Nadra M, De Saad A. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from Argentinean herbs infusions. *Food Control*, 2010;21(5):779-785
7. Ibarrola D, Degen R. (Editores). Catálogo ilustrado de 80 plantas medicinales del Paraguay. Facultad de Ciencias Químicas - UNA y Agencia de Cooperación Internacional del Japón, Asunción, 2011.
8. Parodi T, Vargas A, Krewer C, Baldixerotto B, Heinzmann B, Minozzo M. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2013;56(2):283-292
9. Azarmi F, Nazemieh H, Dappour M. Growth and essential oil production of *Aloysia citriodora* L. Grown in Greenhouse using soil and floating system. *Res J Biol Sci*, 2012;7(4):148-151
10. Díaz O, Duran D, Martínez J. Estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* L'Her Britton cultivada en diferentes regiones de Colombia. *Scientia et Technica*, 2007;13(33):351-353
11. Butterweck V, Jürgenliemk G, Nahrstedt A, Winterhoff H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* Show Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test. *Planta Med*, 2000;66(1):3-6
12. Qnais E, Abu-Safieh K, Abu-Dieyeh M, Abdulla F. Antinociceptive Effect of Two Flavonoids from *Aloysia Triphylla* L. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2009;2(4):167-170
13. Maleki M, Kheliany H, ERam S, Maleki S, Mohammadi S. Antidepressant activity of ethanolic extract, chloroform extract and aqueous extract of *Aloysia Triphylla* L. in the FST and in the TST in male mice. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2012;7(5):S856
14. Liu Y, Jia G, Gou L, Sun L, Fu X, Yin X, et al. Antidepressant-like effects of tea polyphenols on mouse model of chronic unpredictable mild stress. *Pharmacology, Biochemistry And Behavior* 2013; 104:27-32
15. Pathak L, Agrawal Y, Dhir A. Natural polyphenols in the management of major depression. *Expert Opinion On Investigational Drugs* 2013; 22(7):863-880
16. Bergner C, Smolinsky A, Hart P, Dufour B, Egan R, Laporte J, et al. Mouse Models for Studying Depression-Like States and Antidepressant Drugs. *Methods Mol Biol* 2010; 602:272-282
17. Aslam M. Tail suspension test to evaluate the antidepressant activity of experimental drugs. *Bangladesh Journal Of Pharmacology* 2016; 11(2):292-294
18. National Research Council (US) Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. Washington (DC): National Academies Press (US); 2003. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK43327/>
19. Council for the International Organization of Medical Sciences (CIOMS): Biomedical research involving animals. International Guiding Principles, Geneva, 1993. Disponible en: http://www.uchile.cl/documentos/version-en-pdf_76826_21_5937.pdf
20. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 1985;85(3):367-370
21. Wiley J. Model of Affective Illness: Forced Swimming and Tail Suspension Tests in Rodents *Current Protocols in Pharmacology*. 2000. Unit 5.8: 5.8.1 –5.8.9.
22. Cryan J, 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: 571 - 625.
23. Masuda Y, Ishigooka S, Matsuda Y. Behaviors of Mice Give forced-Swimming. *Exp. Anim*. 2001; 50(4):331-335.
24. Laines G. Estudio del efecto Antidepresivo del extracto Hidroalcohólico de hojas de *Hypericum Laricifolium* (Chinchango) en ratones albinos. [Tesis de maestría]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú; 2010
25. Abuhamdah S, Abuhamdah R, Shakya A, Al-Olimat S, Chazot P. Neuropharmacological evaluation of selected Jordanian traditional herbal medicines. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2014;8(48):1235-1241
26. Ragone M, Sella M, Conforti P, Volonté M, Consolini A. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenums. *J Ethnopharmacol*, 2007;113(2):258-66.