



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**



**Evaluación de la actividad antidepresiva del extracto  
etanólico de la corteza de *Anadenanthera colubrina*  
“vilca” o “huayo” en el test de nado forzado en ratas**

**Tesis**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA**

**Presentado por:**

**Bach. Edert Abel Samamé Caramutti**

**LAMBAYEQUE - PERÚ**

**2015**

**Evaluación de la actividad antidepresiva del extracto  
etanólico de la corteza de *Anadenanthera colubrina*  
“vilca” o “huayo” en el test de nado forzado en ratas**

**Tesis**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA**

**Presentado por:**

**Bach. Edert Abel Samamé Caramutti**

**Aprobada por:**

**Dr. Guillermo Delgado Paredes  
Presidente**

-----

**MSc. Consuelo Rojas Idrogo  
Secretario**

-----

**Lic. Julio César Silva Estela  
Vocal**

-----

**Dr. Pedro Jorge Chimoy Effio  
Patrocinador**

-----

## **Dedicatoria**

*Este trabajo de tesis está dedicado a mi familia, mis padres Abel y Roxana, mis hermanos Manolo y Maricarmen, mis sobrinos Adrián y Angie, y mi cuñada Lady, que siempre estuvieron presentes brindándome su apoyo durante la realización del proyecto.*

*También está dedicado a mis familiares, especialmente a mis tías Clara, Rosa y Alodia, y a mis primos Ricky y Techí, que me ayudaron de muchas maneras en el desarrollo de este trabajo de investigación.*

*Finalmente, quiero dedicárselo a mis amigos Emil, Pancho, Dunalia, Alex, Mileny, Julio, Yakory, Karen, Virginia, Erick, Sheva y Lalo, y a los Dres. Luis Ángel Aguilar Mendoza y Pedro Jorge Chimoy Effio, quienes confiaron en mí para la realización de este estudio.*

## **Agradecimientos**

*Quiero agradecer a mi familia y familiares, quienes me brindaron su ayuda y apoyo durante toda la realización de la tesis.*

*También agradezco a mis Profesores de la UNPRG, Dr. Santos Llatas, Lic. Jorge Chanamé, MSc. Consuelo Rojas, Dr. Guillermo Delgado y Lic. Julio Silva, así como a mis amigos Dunalía Llatas, Francisco Chafloque y Emil Zuta, quienes me instruyeron y brindaron apoyo desinteresado durante la ejecución del trabajo.*

*Asimismo, deseo mostrar mi gratitud a los integrantes del LABNEURO en las personas del Ing. Richard “Chuchuy” Cisneros, T.M. Roy “La ‘U’ es la ‘U’” Andrade, Blgo. Luis Lerma, Dr. Christian Pitot, Dr. Jorge Osada, entre otros, que me brindaron financiamiento y asesoría para la realización del proyecto.*

*Finalmente, quiero agradecer a mi Asesor y Co-asesor, Dres. Pedro Jorge Chimoy Effio y Luis Ángel Aguilar Mendoza, así como al Dr. Richard Garratt, por apoyarme y guiarme para llevar el proyecto a buen puerto.*

## CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN. -----	1
II.	ANTECEDENTES. -----	4
	2.1 Estrés y depresión. -----	4
	2.2 Modelos animales predictivos de actividad antidepresiva: FST. ----	6
	2.3 Posible rol de los neurotransmisores monoaminérgicos en la depresión. -----	8
	2.4 Depresión, dolor e inflamación. -----	9
	2.5 Uso de plantas medicinales en el tratamiento de la depresión. ----	11
III.	MATERIAL Y MÉTODOS. -----	17
	3.1 Material. -----	17
	3.1.1 Material biológico. -----	17
	3.1.2 Material de laboratorio. -----	18
	3.1.3 Material diverso. -----	18
	3.1.4 Reactivos. -----	18
	3.1.5 Equipos e instrumentos. -----	18
	3.2 Métodos. -----	22
	3.2.1 Primera fase: Preparación de los extractos etanólicos de la corteza (EEC) de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo”. -----	22
	a. Obtención del EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo”. -----	22
	b. Pruebas de selección de solvente para el EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo”. -----	23
	3.2.2 Segunda fase: Evaluación de la actividad antidepresiva del extracto etanólico de la corteza (EEC) de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo”. -----	23
	a. Prueba de toxicidad aguda del EEC de <i>Anadenanthera</i> <i>colubrina</i> “vilca” o “huayo” -----	24
	b. Tratamientos experimentales. -----	26
	b.1 Tratamiento 1 (T1) – Selección de una dosis no efectiva / subefectiva en la administración oral aguda del EEC de	

<i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo” (Screening) (1 día). -----	26
b.2 Tratamiento 2 (T2) – Administración oral crónica del EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo” (18 días). -----	27
b.3 Tratamiento 0 (T0) – Grupos Control. -----	27
c. Modelo animal predictivo de actividad antidepresiva: Test de Nado Forzado ( <i>Forced Swimming Test</i> , FST). -----	28
c.1 Sesión de Habitación. -----	28
c.2 Administración de los EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo”. -----	29
c.3 Sesión de Prueba. -----	29
c.4 Registro de datos mediante la técnica de muestreo. ----	30
d. Modelo animal de evaluación de la actividad locomotora: <i>Open Field Test</i> (OFT). -----	31
e. Diseño experimental y análisis estadísticos. -----	32
f. Tratamientos en estudio. -----	33
IV. RESULTADOS. -----	35
4.1 Primera fase: Preparación de los extractos etanólicos de la corteza (EEC) de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo”. -----	35
4.1.1 Obtención del EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo”. -----	35
4.1.2 Pruebas de selección de solvente para el EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo”. -----	39
4.2 Segunda fase: Evaluación de la actividad antidepresiva del extracto etanólico de la corteza (EEC) de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo”. -----	43
4.2.1 Prueba de toxicidad aguda del EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> “vilca” o “huayo” -----	47
4.2.2 Pruebas comportamentales: Test de nado forzado ( <i>Forced Swimming Test</i> , FST) y <i>Open Field Test</i> (OFT). -----	48
V. DISCUSIÓN. -----	62

VI. CONCLUSIONES. -----	73
VII. RECOMENDACIONES. -----	74
VIII. RESUMEN. -----	75
IX. REFERENCIAS. -----	76
ANEXOS. -----	89

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Registro del peso de las unidades experimentales a su llegada al bioterio del Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento (LABNEURO). -----	46
<b>Tabla 2.</b> Registro del peso de las unidades experimentales 10 días después de su llegada. -----	46
<b>Tabla 3.</b> Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencias de los comportamientos en el FST para los tratamientos agudos con el EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> (50; 100; 200 mg/kg) vs. Grupo Control 1. -----	58
<b>Tabla 4.</b> Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencias de los comportamientos en el OFT para los tratamientos agudos con el EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> (50; 100; 200 mg/kg) vs. Grupo Control 1. -----	58
<b>Tabla 5.</b> Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el FST para los tratamientos crónicos con el EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> (50 mg/kg) vs. Grupo Control 2. -----	59
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el OFT para los tratamientos crónicos con el EEC de <i>Anadenanthera colubrina</i> (50 mg/kg) vs. Grupo Control 2. -----	59
<b>Tabla 7.</b> Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el FST para los tratamientos agudos (Grupo Control 1) vs. crónicos (Grupo Control 2) con vehículo. -----	60
<b>Tabla 8.</b> Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el OFT para los tratamientos agudos (Grupo Control 1) vs. crónicos (Grupo Control 2) con vehículo. -----	60
<b>Tabla 9.</b> Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el FST para los tratamientos agudos (EEC: 50 mg/kg) vs. crónicos (EEC: 50 mg/kg). -----	61
<b>Tabla 10.</b> Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el OFT para los tratamientos agudos (EEC: 50 mg/kg) vs. crónicos (EEC: 50 mg/kg). -----	61

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol de <i>A. colubrina</i> en el bosque primario del centro poblado Las Juntas, San Ignacio, Cajamarca (a) del cual se tomaron muestras de la corteza (b). -----	19
<b>Figura 2.</b> Cilindro del FST y <i>open field</i> del OFT. -----	20
<b>Figura 3.</b> Jeringa de 1 mL y sonda orogástrica metálica para la administración de soluciones por vía oral ( <i>gavage</i> ). -----	21
<b>Figura 4.</b> (a) Flujograma del desarrollo del trabajo, y (b) Esquema de los tratamientos orales agudos y crónicos con el EEC de <i>A. colubrina</i> . -----	34
<b>Figura 5.</b> Maceración: (a) Elementos utilizados: frasco color ámbar, producto de la molienda y etanol (alcohol etílico) 96°; (b) Mezcla de los elementos antes del proceso de macerado. ---	37
<b>Figura 6.</b> Extracto etanólico de la corteza (EEC) de <i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan “vilca” o “huayo”. -----	38
<b>Figura 7.</b> Pruebas de dilución del EEC de <i>A. colubrina</i> empleando s.s. 0,9% y etanol 96°. -----	41
<b>Figura 8.</b> Pruebas de dilución del EEC de <i>A. colubrina</i> empleando (a) Tween 80, (b) Etanol 96°, y (c) DMSO. -----	42
<b>Figura 9.</b> Pre-prueba del FST para la determinación de la altura del agua en el test. -----	44
<b>Figura 10.</b> Ratas Holtzman hembras nulíparas (2 a 3 meses de edad) utilizadas como unidades experimentales en el estudio. -----	45
<b>Figura 11.</b> Efecto del tratamiento agudo con el EEC de <i>A. colubrina</i> (50 mg/kg) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT. -----	49
<b>Figura 12.</b> Efecto del tratamiento agudo con el EEC de <i>A. colubrina</i> (100 mg/kg) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT. -----	50
<b>Figura 13.</b> Efecto del tratamiento agudo con el EEC de <i>A. colubrina</i> (200 mg/kg) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT. -----	51

<b>Figura 14.</b> Efecto del tratamiento agudo con vehículo (Grupo Control 1) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT. -----	52
<b>Figura 15.</b> Efecto del tratamiento crónico con el EEC de <i>A. colubrina</i> (50 mg/kg) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT. -----	54
<b>Figura 16.</b> Efecto del tratamiento crónico con vehículo (Grupo Control 2) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT. -----	55
<b>Figura 17.</b> Comparación del efecto de los tratamientos agudos con diferentes dosis del EEC de <i>A. colubrina</i> (50; 100; 200 mg/kg) y grupo Control 1 en el FST (a) y el OFT (b). Las barras representan las medias de las frecuencias de cada comportamiento. -----	56
<b>Figura 18.</b> Comparación del efecto de los tratamientos crónicos con el EEC de <i>A. colubrina</i> (50 mg/kg) y grupo Control 2 en el FST (a) y el OFT (b). Las barras representan las medias de las frecuencias de cada comportamiento. -----	57

## INDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Clasificación taxonómica de *Anadenanthera colubrina*.
- Anexo 2.** Estructura de algunos metabolitos aislados de la corteza de *Anadenanthera colubrina*.
- Anexo 3.** Bosque primario del Centro poblado Las Juntas, Provincia de San Ignacio, Departamento de Cajamarca.
- Anexo 4.** Muestras conservadas de ramas, flores y frutos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan “vilca” o “huayo” del Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT).
- Anexo 5.** Ambiente del bioterio del Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento (LABNEURO) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).
- Anexo 6.** Registro del peso, dosis y volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* previo a la prueba de toxicidad aguda.
- Anexo 7.** Tratamientos agudos – Pesaje de las unidades experimentales de cada grupo para la determinación del volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* o vehículo (10% de Tween 80 en s.s. 0,9%) a ser administrados de acuerdo a la dosis correspondiente.
- Anexo 8.** Tratamientos crónicos – Pesaje de las unidades experimentales de cada grupo para la determinación del volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* o vehículo (10% de Tween 80 en s.s. 0,9%) a ser administrados de acuerdo a la dosis correspondiente en los días 1 a 17 de tratamiento crónico.
- Anexo 9.** Tratamientos crónicos – Pesaje de las unidades experimentales de cada grupo para la determinación del volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* o vehículo (10% de Tween 80 en s.s. 0,9%) a ser administrados de acuerdo a la dosis correspondiente en el último día de tratamiento crónico (día 18).
- Anexo 10.** Cálculo de la concentración y volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* y vehículo a ser administrados a las unidades experimentales en base a las dosis determinadas.

## I. INTRODUCCIÓN

La depresión, también llamada trastorno depresivo mayor o depresión unipolar (Morales-Medina et al, 2010; Nestler et al, 2002; Wong et al, 2013), es un desorden relacionado al estrés (Nestler et al, 2002) que afecta a aproximadamente el 21% de la población mundial (Stepanichev et al, 2014). El tratamiento de la depresión se basa principalmente en la prescripción de fármacos antidepresivos de segunda generación, los cuales, a pesar de presentar mayor efectividad y menos efectos secundarios que las drogas de primera generación, no muestran una efectividad que pueda considerarse elevada, llegando a exhibir una tasa de respuesta menor al 50% y una alta reincidencia, por lo que están lejos de considerarse ideales (Hendrie et al, 2013). Por este motivo, se hace necesario el desarrollo de drogas antidepresivas que presenten mayor efectividad y menos efectos secundarios que los fármacos actualmente disponibles. Una manera de promover el desarrollo de potenciales medicamentos antidepresivos es la evaluación de plantas utilizadas en la medicina popular para el tratamiento de los desórdenes del humor.

Existen muchos estudios experimentales en los que se ha evaluado, tanto clínica como preclínicamente, la actividad antidepresiva de plantas utilizadas en la medicina popular para tratar este tipo de desórdenes (Muszyńska et al, 2015; Saki et al, 2014). Muchos de estos estudios han utilizado plantas pertenecientes a la familia de las fabáceas (Khursheed et al, 2014; Ebrahimzadeh et al, 2014; Mizuki et al, 2014). A pesar de que los estudios evaluando la actividad antidepresiva de fabáceas datan desde finales del siglo pasado, no existen estudios que evalúen la actividad antidepresiva de *Anadenanthera colubrina*.

*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan “vilca” o “huayo” (Elferink, 2000; Marcelo-Peña et al, 2010) es una fabácea sudamericana cuya corteza ha sido utilizada en la medicina popular para tratar una diversidad de males (Agra et al, 2007; Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013). Aunque varios estudios fitoquímicos realizados con esta estructura han detectado la presencia de una variedad de metabolitos secundarios entre los que se destacan catequinas, esteroles, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos, terpenoides y xantonas (De Sousa Araújo et al, 2008; Pessoa et al, 2012; Santos et al, 2013; Weber et al, 2011), son pocos los estudios que han identificado específicamente los compuestos presentes en la corteza y por ende se han realizado pocos trabajos que muestren la importancia biológica de estos compuestos aislados (Weber et al, 2011). Aun así, existen investigaciones que han demostrado las propiedades analgésicas y antiinflamatorias de varios de sus metabolitos (De Lima et al, 2013; Fu et al, 2013; Montserrat-de la Paz et al, 2012; Santos et al, 2013; Thao et al, 2015). No obstante, y a pesar de los estudios que han sugerido que el dolor y la depresión comparten las mismas bases neuroquímicas (Micó et al, 2006; Nekovarova et al, 2014), y los que adicionalmente señalan una posible contribución de la neuroinflamación en el desarrollo de la depresión (Kim et al, 2016; Nekovarova et al, 2014), no existen reportes que evalúen los efectos antidepresivos de los metabolitos específicos ni de la corteza de *A. colubrina*, pese a la actividad antidepresiva mostrada por varios tipos de catequinas (Lee et al, 2013), esteroles (Ishola et al, 2014), fenoles, flavonoides, saponinas, terpenoides (Bahramsoltani et al, 2015), taninos (Xu et al, 2010) y xantonas (Zhao et al, 2014).

En este sentido, y teniendo en cuenta:

- (1) los estudios que han sugerido que el dolor y la depresión comparten las mismas bases neuroquímicas, reafirmando reportes que

indican que varios antidepresivos poseen propiedades analgésicas (Micó et al, 2006; Nekovarova et al, 2014),

(2) los reportes que señalan una posible contribución de la neuroinflamación en el desarrollo de la depresión, corroborado por el hallazgo de las propiedades antiinflamatorias de algunos antidepresivos (Kim et al, 2016; Nekovarova et al, 2014), y

(3) la detección de principios activos con actividad analgésica y antiinflamatoria como catequinas, esteroides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos, terpenoides y xantonas en la corteza de *A. colubrina* (De Lima et al, 2013; Fu et al, 2013; Garrido-Suárez et al, 2014; Montserrat-de la Paz et al, 2012; Moreira et al, 2014; Pessoa et al, 2012; Quiñonez-Bastidas et al, 2013; Said et al, 2015; Santos et al, 2013; Thao et al, 2015),

nuestro estudio tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antidepresiva del extracto etanólico de la corteza (EEC) de *A. colubrina* en un modelo animal predictivo de actividad antidepresiva, el test de nado forzado (*forced swimming test*, FST) en ratas; este test implicó una modificación de los protocolos descritos por (Porsolt et al, 1977, 2001) y (Cryan et al, 2005b), y fue complementado con un test de evaluación de la actividad locomotora de las unidades experimentales, el *open field test* (OFT) (Crawley, 1985; Prut y Belzung, 2003; Ribeiro et al, 2006) para determinar si los efectos observados en el FST podrían deberse a un efecto del EEC sobre la locomoción general de los animales de experimentación.

Nuestro estudio es importante para establecer la existencia de algún posible papel antidepresivo de *A. colubrina*, y su potencial uso en el desarrollo de nuevas drogas antidepresivas.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Estrés y depresión

El término “estrés” fue empleado por Hans Selye (Selye, 1936) para describir una amenaza real o potencial a la homeostasis (Joca et al, 2003). En este aspecto, el estrés se define como una respuesta inespecífica frente a alguna demanda sobre el organismo (Heinrichs y Koob, 2006), respuesta formada por tres componentes principales: (1) el estímulo de entrada, o *estresor*; (2) el proceso evaluativo; y (3) la respuesta de salida, o *respuesta de estrés* (Kollack-Walker et al, 2007). Esta respuesta va acompañada por cambios fisiológicos que incluyen la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (eje HPA) y el sistema nervioso simpático (Heinrichs y Koob, 2006).

La activación del eje HPA se inicia en la región parvocelular medial del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, la cual secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que estimula la síntesis y liberación de adrenocorticotropina (ACTH) por la pituitaria anterior. A su vez, la ACTH estimula la síntesis y descarga de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) por la corteza adrenal (Nestler et al, 2002; Lupien et al, 2009), los cuales ejercen profundos efectos sobre el metabolismo general, tratando de mantener la homeostasis, movilizando energía para las reacciones de lucha o huida (Kollack-Walker et al, 2007), y afectando el comportamiento mediante acciones directas sobre varias regiones cerebrales (Nestler et al, 2002). Se cree que los efectos adversos del estrés resultan parcialmente de (1) la activación o inhibición prolongadas de ciertos sistemas neurotransmisores y rutas intracelulares y/o (2) la exposición crónica a sustancias neuroactivas como los glucocorticoides (Fuchs y Flügge, 2007).

El trastorno depresivo mayor, depresión unipolar o depresión, es un desorden neuropsiquiátrico complejo con una etiología aún no del todo clara y posiblemente muchos factores de riesgo (Wong et al, 2013). Aunque se han propuesto diversas hipótesis para explicar la etiología de la depresión y los desórdenes asociados con ella (las cuales incluyen la existencia de estrés crónico, errores en la neurogénesis adulta, neuroplasticidad alterada, disfunciones en la transmisión monoaminérgica y factores genéticos), ninguna de estas ha logrado dilucidar completamente la sintomatología humana (Morales-Medina et al, 2010). No obstante esto, es bien sabido que la exposición a varios tipos de estrés puede influir en el desarrollo de patologías físicas y psiquiátricas como la depresión (Cryan et al, 2005b; Heinrichs y Koob, 2006). En tal sentido, el trastorno depresivo se considera frecuentemente como un desorden relacionado al estrés, pues su aparición muchas veces está relacionada con la exposición a alguna forma de este (Nekovarova et al, 2014; Nestler et al, 2002), precipitando su desarrollo e influenciando su curso y severidad; además, la neurobiología y manifestaciones clínicas de la respuesta de estrés y la depresión son muy similares (Gold, 2005). A pesar de lo antes mencionado, debe indicarse que el estrés *per se* no es suficiente para causar depresión (Nestler et al, 2002).

Los pobladores del antiguo Imperio Incaico ya conocían la existencia de este desorden psiquiátrico, el cual recibía diversos nombres quechuas como *pputirayay huaccanayay unccoy*, *putirayay*, *kusiymana*, o *llakiysapa*, que hacían referencia a la “melancolía” con que los cronistas definían estos cuadros. Según las crónicas, los trastornos depresivos se encontraban entre los desórdenes mentales más importantes de la época, y eran muy frecuentes entre la familia real; de hecho, se considera que la “melancolía” era la enfermedad mental más importante del antiguo Perú (Elferink, 2000).

## 2.2. Modelos animales predictivos de actividad antidepresiva: FST

Aunque los modelos animales de depresión deberían satisfacer al menos cuatro criterios respecto a la enfermedad humana (similitud de etiología, bioquímica, sintomatología y tratamiento) (Borsini y Meli, 1988), los modelos actualmente disponibles dependen de uno de dos principios: (1) el efecto de drogas antidepresivas conocidas, o (2) las respuestas al estrés (Nestler et al, 2002). Del mismo modo, se han utilizado dos enfoques para estudiar potenciales fármacos antidepresivos: (1) el empleo de modelos empíricos que tratan de encontrar las condiciones experimentales necesarias para que drogas antidepresivas ejerzan efectos farmacológicos no mostrados por drogas de otros tipos, y (2) el uso de modelos teóricos que tratan de reproducir en animales la sintomatología humana de la depresión (Borsini y Meli, 1988). Algunas de estas pruebas han sido efectivas en la predicción de la eficacia de nuevos antidepresivos, a la vez que proporcionan modelos útiles para estudiar los mecanismos subyacentes al estrés y a las respuestas antidepresivas (Nestler et al, 2002). No obstante, resulta evidente que los modelos sensibles a fármacos antidepresivos son una sobresimplificación de una enfermedad compleja como la depresión, por lo que nunca serán completamente válidos (Borsini y Meli, 1988).

El test de nado forzado (*forced swimming test*, FST) (Porsolt et al., 1977) es un modelo predictivo de actividad antidepresiva basado en la observación de que los roedores forzados a nadar en un espacio estrecho del cual no hay escapatoria (por ejemplo, un cilindro con agua) finalmente adoptan, después de un período inicial de actividad vigorosa, una postura inmóvil característica, moviéndose únicamente lo necesario para mantener sus cabezas fuera del agua (Cryan et al, 2005b; Porsolt et al, 2001).

Se ha mostrado que los tratamientos antidepresivos reducen la inmovilidad, a la vez que aumentan los movimientos activos de escape durante el test (Cryan et al, 2005b), por lo que el FST es el modelo más utilizado en la búsqueda preclínica de probables drogas antidepresivas (Luo et al, 2008; Stepanichev et al, 2014). Se ha sugerido que esta postura inmóvil es un reflejo de que los roedores han aprendido de que el escape es imposible y han perdido todas las esperanzas (“desesperanza comportamental”) (Porsolt et al, 1977, 2001), aunque dicha inmovilidad sería más bien una respuesta adaptativa ante una situación de estrés (Borsini y Meli, 1988).

Si bien el FST tradicional de (Porsolt et al, 1977) sólo contemplaba el registro de tiempo de dos comportamientos en el cilindro de nado, (a) el comportamiento pasivo (inmovilidad) y (b) el comportamiento activo (nado, escalamiento, etc.), así como el uso de agua a una altura de 15-18 cm, no permitía la detección de un tipo de antidepresivos muy utilizados en la clínica, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), por lo que posteriormente se sugirieron y adoptaron modificaciones en el test que permitieran detectar este tipo de compuestos (Borsini et al, 1989; Detke y Lucki, 1996; Detke et al, 1995). Este FST modificado considera los tiempos de (a) inmovilidad, (b) escalamiento, y (c) nado, además de aumentar la altura del agua a 30 cm. La justificación del registro de estos tres comportamientos radica en que la estimulación de los comportamientos activos de escalamiento y nado permite conocer qué tipos de sistemas neurotransmisores están implicados en el efecto mostrado por las drogas, pues se ha reportado que la activación del sistema catecolaminérgico (principalmente el noradrenérgico) estimula el comportamiento de escalamiento, mientras que la estimulación del sistema serotoninérgico estimula el comportamiento de nado (Cryan et al, 2005a,b; Detke y Lucki, 1996; Detke et al, 1995).

### **2.3. Posible rol de los neurotransmisores monoaminérgicos en la depresión**

El papel de los neurotransmisores del tipo monoaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina, histamina, y serotonina) durante los episodios de estrés y depresión ha sido ampliamente estudiado. Mientras el estrés agudo conduce a alteraciones transitorias en los sistemas monoaminérgicos que contribuyen a restaurar la homeostasis, el estrés crónico puede inducir un desbalance de larga duración en los neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC) (Flügge et al, 2004). Incluso, algunos investigadores consideran probable que la disregulación de los sistemas monoaminérgicos sea una causa suficiente, aunque no necesaria, de la depresión (Mathé et al, 2007).

El rol de estos neurotransmisores en el trastorno depresivo fue dilucidándose a raíz de la revolución en el tratamiento de la depresión ocurrida 60 años atrás, cuando se descubrieron dos clases de agentes con propiedades antidepresivas: los antidepresivos tricíclicos (AT) y los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO). Los mecanismos de acción agudos de estas drogas implican la inhibición de la recaptación por los transportadores de serotonina o noradrenalina por parte de los AT, y la inhibición de la MAO (un enzima catabólico de los neurotransmisores monoaminérgicos) en el caso de los IMAO. Esto llevó al desarrollo de medicamentos de segunda generación como los ISRS y los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina, muy utilizados en la actualidad (Nestler et al, 2002). En este sentido, aunque no se comprende del todo el mecanismo de acción de los antidepresivos, se ha observado que estos actúan sobre los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico del cerebro, con pruebas más concluyentes en el caso de la serotonina (5-HT) que en el de la noradrenalina (NA) (Kandel et al, 2001).

## 2.4. Depresión, dolor e inflamación

Aunque a primera impresión pareciera no existir una relación entre la base neuroquímica del dolor y nuestra evaluación de la actividad antidepresiva de *A. colubrina*, debemos mencionar que se ha sugerido que el dolor y la depresión comparten mecanismos bioquímicos en común (Micó et al, 2006; Nekovarova et al, 2014), y este fue uno de los puntos más importantes en la elección de *A. colubrina*, específicamente su corteza, para este estudio.

En este aspecto, se ha observado que varios antidepresivos poseen un efecto analgésico, y aunque varios mecanismos farmacológicos parecen estar implicados en dicho efecto, se cree que esta acción analgésica es mediada en el SNC, principalmente a través del refuerzo de las vías bulboespinales monoaminérgicas descendentes inhibitorias, mediante la inhibición de la recaptación de monoaminas y la posterior estimulación de los sistemas de inhibición del dolor, pues varios de los principales sistemas neurotransmisores comprometidos en el desarrollo de desórdenes depresivos (5-HT y NA) también están implicados en la regulación de la sensación nociceptiva a diferentes niveles del sistema nervioso (Micó et al, 2006; Nekovarova et al, 2014).

El dolor es una submodalidad de sensaciones somáticas (como las del tacto y la presión) con una función protectora, cuya percepción consiste en una experiencia sensitiva y emocional desagradable asociada con una lesión tisular (Basbaum y Jessell, 2001; Snell, 1999b).

Los “estímulos dolorosos” en la piel o el tejido subcutáneo activan una serie de terminales de nociceptores, que son terminaciones periféricas de neuronas sensitivas primarias cuyos somas se localizan en los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal. Las fibras

aferentes nociceptivas pertenecen a los tipos A $\delta$  y C (Snell, 1999a), y terminan predominantemente en el asta posterior de la médula espinal.

La información nociceptiva es transmitida desde la médula espinal hasta el tálamo y la corteza cerebral a través de diversas vías ascendentes, y puede ser controlada mediante mecanismos que regulan la percepción del dolor. Estos mecanismos son ejercidos a través de circuitos nerviosos cuyo sitio inicial de regulación se encuentra en la médula espinal. Uno de los mecanismos reguladores más importantes consiste en la estimulación de vías descendentes inhibitoras de las neuronas nociceptivas de la médula espinal mediante los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico. Estas vías inhibitoras establecen conexiones excitadoras con grupos neuronales del bulbo raquídeo, particularmente con neuronas serotoninérgicas del núcleo magno del rafe, cuya estimulación inhibe neuronas del asta posterior, entre ellas las que responden a la estimulación nociva. Este no es el único sistema regulador de la percepción dolorosa, pues existe otro sistema descendente inhibitor que se origina en el *locus coeruleus* noradrenérgico. Ambos sistemas (serotoninérgico y noradrenérgico) también inhiben el dolor mediante la estimulación de interneuronas opioides locales.

Así el reforzamiento de los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico podría ejercer sus efectos analgésicos elevando la concentración de uno o ambos neurotransmisores en el organismo, y estimulando las vías inhibitoras de los circuitos del dolor, lo cual explicaría el efecto analgésico de los antidepresivos.

Diversos reportes han puesto énfasis en una posible contribución de la neuroinflamación en el desarrollo del trastorno depresivo (Kim et al, 2016; Nekovarova et al, 2014). En este sentido, se ha observado que el estrés crónico y la posterior liberación de citoquinas, como la

interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), la interleuquina-6 (IL-6), y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), conducen a un proceso que ha sido denominado neuroinflamación crónica, en el cual las respuestas inflamatorias periféricas se expresan en el SNC, lo que contribuiría al desarrollo de la depresión. Este hecho es corroborado por diversos hechos como el hallazgo de mayores concentraciones de ciertas citoquinas proinflamatorias en pacientes depresivos, la inducción de depresión mediante la administración de citoquinas proinflamatorias exógenas, las propiedades antiinflamatorias mostradas por algunos fármacos antidepressivos como el ISRS fluoxetina, y los efectos antidepressivos mostrados por antiinflamatorios no esteroideos (AINE). De este modo, se ha propuesto que el tratamiento de la depresión con drogas antiinflamatorias sería una manera de determinar los mecanismos subyacentes (Nekovarova et al, 2014).

## 2.5. Uso de plantas medicinales en el tratamiento de la depresión

Existen muchos estudios experimentales en los que se ha evaluado, tanto clínica como preclínicamente, la actividad antidepressiva de plantas medicinales utilizadas popularmente para tratar este tipo de desórdenes, varias de las cuales son presentadas en las revisiones realizadas por (Muszyńska et al, 2015) y (Saki et al, 2014). En este aspecto, *Hypericum perforatum* “hierba de San Juan” (Marrelli et al, 2015) y *Crocus sativus* “azafrán” (Christodoulou et al, 2015) son dos de las plantas más estudiadas por las propiedades antidepressivas mostradas tanto en humanos como en animales de laboratorio.

Muchas de estas investigaciones han utilizado plantas pertenecientes a la familia *Fabaceae*. Así, el estudio de (Khursheed et al, 2014) reportó que el extracto etanólico de las semillas de *Trigonella foecum-graecum* posee un efecto antidepressivo en roedores. Por su parte,

(Ebrahimzadeh et al, 2014) demostraron que el extracto metanólico de *Vicia sojakii* tenía actividad antidepresiva en ratones, mientras que (Mizuki et al, 2014) hicieron lo propio con *Butea superba*.

El género *Anadenanthera* pertenece a la sección *Mimosoideae* de la familia *Fabaceae*, orden *Fabales* (Anexo 1), y su primera descripción científica data de 1737 en el Hortus Cliffortianus. Este género está compuesto únicamente por dos especies, *A. peregrina* (L.) Speg, y *A. colubrina* (Vell.) Brenan (Weber et al, 2011), de las cuales sólo *A. colubrina* está presente en el Perú.

*Anadenanthera colubrina* es un árbol nativo sudamericano que crece en bosques tropicales por encima de los 400 m.s.n.m. (Santos et al, 2013). Existen dos variedades de esta especie, (a) la var. Cebil (Griseb.) Altschul y (b) la var. Colubrina; de estas, sólo la var. Cebil se desarrolla en nuestro país, principalmente en zonas ubicadas entre los 600 y 2000 m.s.n.m. en regiones como Amazonas, Apurímac, Cajamarca, Cusco, Junín y Piura, donde se le conoce como “vilca” o “huayo” (Elferink, 2000; Marcelo-Peña et al, 2010).

En la literatura (Marcelo-Peña et al, 2010) se le describe como un árbol de 4 a 8 metros de altura, con una corteza externa gris oscura y estriada, ocasionalmente con presencia de espinas. Las ramas terminales son cilíndricas, con hojas bipinnadas, alternas y esparcidas, un raquis de entre 4 y 10 cm de longitud, 5 a 20 pares de pinnas opuestas, y 20 a 80 pares de foliolulos lineares glabros en cada pinna, de 2 a 3 por 0,7 mm. Posee inflorescencias en panículas de cabezuelas, y flores hermafroditas, blancas, con un cáliz cupuliforme con 5 lóbulos, corola verde pálida y 10 estambres libres. Sus frutos son legumbres de hasta 25 cm de longitud, de 1 a 3 cm de ancho, planos, y comprimidos entre las semillas. Su floración ocurre entre julio y octubre, y su fructificación en diciembre.

*A. colubrina* ha sido ampliamente utilizada en la medicina popular como anticoagulante (Albuquerque et al, 2007); antiséptico (Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013), broncodilatador (Medeiros et al, 2013), expectorante (Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013) y cicatrizante (Cartaxo et al, 2010), o para tratar males tan diversos como alergias (Medeiros et al, 2013), anemias (Albuquerque et al, 2007), asma (Albuquerque et al, 2007), bronquitis (Agra et al, 2007; Albuquerque et al, 2007; Medeiros et al, 2013), cáncer (Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013), congestión nasal (Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013), dolores (Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013), diarreas (Medeiros et al, 2013), gripe (Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013), golpes (Albuquerque et al, 2007), heridas (Albuquerque et al, 2007; Medeiros et al, 2013), infecciones (Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013), inflamaciones (Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013), problemas renales (Medeiros et al, 2013) o pulmonares (Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013), tos (Agra et al, 2007; Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013) y tuberculosis (Albuquerque et al, 2007; Medeiros et al, 2013).

Las partes utilizadas de esta fabácea son la corteza (Agra et al, 2007; Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010), el tronco, líber, flores, hojas y frutos (Albuquerque et al, 2007), o la resina (Cartaxo et al, 2010). En este aspecto, la corteza bajo la forma de sirope, cocimiento, infusión o macerado ha sido empleada para tratar enfermedades (Agra et al, 2007; Monteiro et al, 2006; Santos et al, 2013), mientras que los frutos en maceración o infusión poseen propiedades narcóticas y venenosas (Agra et al, 2007), incluso existiendo reportes de intoxicación de animales de producción por varias partes de esta especie (Bezerra et al, 2012; Neto et al., 2013).

La corteza de *A. colubrina* ha sido utilizada en la medicina popular para tratar una diversidad de males (Agra et al, 2007; Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013). Aunque varios estudios fitoquímicos realizados con esta estructura han detectado la presencia de una variedad de metabolitos secundarios, entre los que destacan catequinas, esteroides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos, terpenoides y xantonas (De Sousa Araújo et al, 2008; Pessoa et al, 2012; Santos et al, 2013; Weber et al, 2011), son pocos los estudios que han identificado específicamente los compuestos presentes en la corteza y por ende se han realizado pocos trabajos que muestren la importancia biológica de estos compuestos aislados (Weber et al, 2011) (Anexo 2). Entre estos estudios, se encuentran los que han mostrado las propiedades analgésicas del lupeol (De Lima et al, 2013) y el  $\beta$ -daucoesterol (Fu et al, 2013), así como la actividad antiinflamatoria de la lupeona (Thao et al, 2015), y el  $\beta$ -sitosterol (Fu et al, 2013; Montserrat-de la Paz et al, 2012). Por su parte, (Santos et al, 2013) mostraron la actividad analgésica y antiinflamatoria del extracto acuoso de la corteza de la planta, corroborando el uso popular de esta estructura en el tratamiento del dolor y la inflamación reportado por (Cartaxo et al, 2010) y (Medeiros et al, 2013), y aunque no se estudiaron los efectos de los metabolitos aislados, esta actividad analgésica y antiinflamatoria fue atribuida, al menos parcialmente, a los taninos, flavonoides y saponinas presentes en la corteza (Santos et al, 2013). Asimismo, (Pessoa et al, 2012) mostraron que la administración oral del extracto hidroalcohólico obtenido de las cortezas interna y externa aceleró la cicatrización de heridas en la piel de ratas. A pesar de los estudios que han sugerido que el dolor y la depresión comparten las mismas bases neuroquímicas (Micó et al, 2006; Nekovarova et al, 2014), no existen reportes que evalúen los efectos antidepresivos de los metabolitos específicos hallados ni de la corteza de *A. colubrina*, pese a que varias investigaciones han puesto al

descubierto la actividad antidepresiva de varios tipos de catequinas (Lee et al, 2013), esteroides (Ishola et al, 2014), fenoles, flavonoides, saponinas, terpenoides (Bahramsoltani et al, 2015), taninos (Xu et al, 2010) y xantonas (Zhao et al, 2014).

Es importante remarcar que nuestro interés en estudiar la actividad antidepresiva de *A. colubrina* se vio incrementado por el hecho de que según las crónicas de la época esta planta era una de las más más utilizadas por los Incas en el tratamiento de la depresión, pues de acuerdo con ellas los incas trataban las enfermedades -entre ellas los trastornos mentales- utilizando una mezcla de magia y productos naturales de origen vegetal o mineral (Elferink, 2000). Estudios realizados con varias de las plantas utilizadas por los incas en el tratamiento de los desórdenes psiquiátricos han mostrado que éstas poseen mucho potencial, corroborando su posible rol antidepresivo. Así por ejemplo, (Machado et al, 2007, 2008) determinaron la actividad antidepresiva de los extractos hexánico y alcohólico de *Schinus molle* “molle” (*Anacardiaceae*) en ratones, mientras que (Freitas et al, 2010, 2013) hicieron lo propio con el extracto etanólico de *Tabebuia (Tecoma) avellanedae* (*Bignoniaceae*, emparentada con *Tecoma leucoxydon*). Por su parte, el estudio de (Ribeiro et al, 2006) reportó que los extractos de *Erythrina velutina* y *E. mulungu* (*Fabaceae*) no mostraron un efecto antidepresivo en ratas. No obstante estos hallazgos, se debe señalar que los Incas empleaban las semillas tostadas y molidas de *A. colubrina*, y estas estructuras han mostrado actividad narcótica y venenosa (Agra et al, 2007; Marcelo-Peña et al, 2010), por lo que desistimos de estudiar las semillas dado que no existen estudios previos que evalúen su toxicidad.

En este sentido, y considerando:

(1) los estudios que han sugerido que el dolor y la depresión comparten las mismas bases neuroquímicas, reafirmando reportes que indican que muchos antidepresivos poseen propiedades analgésicas (Micó et al, 2006; Nekovarova et al, 2014),

(2) los reportes que señalan una posible contribución de la neuroinflamación en el desarrollo de la depresión, corroborado por el hallazgo de las propiedades antiinflamatorias de algunos antidepresivos (Kim et al, 2016; Nekovarova et al, 2014), y

(3) la detección de principios activos con actividad analgésica y antiinflamatoria como catequinas, esteroides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos, terpenoides y xantonas en la corteza de *A. colubrina* (De Lima et al, 2013; Fu et al, 2013; Garrido-Suárez et al, 2014; Montserrat-de la Paz et al, 2012; Moreira et al, 2014; Pessoa et al, 2012; Quiñonez-Bastidas et al, 2013; Said et al, 2015; Santos et al, 2013; Thao et al, 2015),

buscamos evaluar la actividad antidepresiva del extracto etanólico de la corteza (EEC) de *A. colubrina* en el test de nado forzado (*forced swimming test*, FST) en ratas (Porsolt et al, 1977, 2001; Cryan et al, 2005b), complementando el estudio con un test de evaluación de la actividad locomotora de las unidades experimentales, el *open field test* (OFT) (Crawley, 1985; Prut y Belzung, 2003; Ribeiro et al, 2006).

A pesar de las propiedades medicinales descubiertas mediante investigación en *A. colubrina*, no existen reportes que evalúen sus posibles efectos antidepresivos, lo que le otorga mayor importancia al presente estudio en el que se evaluará la actividad antidepresiva de la corteza de esta planta de uso ancestral en nuestro país.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio fue desarrollado en Chiclayo y en el Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento (LABNEURO) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), en Lima.

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Material Biológico

###### **Material vegetal:**

- Muestras de corteza total de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo” (> 3 kg, Figura 1), obtenidas en el centro poblado Las Juntas, provincia de San Ignacio, Departamento de Cajamarca (Anexo 3). Las muestras se sometieron a un proceso de secado bajo sombra durante 14 días.

Dos muestras de ramas con flores y frutos fueron llevadas al Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT), donde fueron identificadas por el Biólogo Eric Rodríguez Rodríguez mediante comparación con muestras colectadas por el Dr. José Campos; nuestras muestras fueron catalogadas con los Códigos HUT 57669 y HUT 57670 (Anexo 4), y los vouchers depositados en el HUT.

###### **Material animal (unidades experimentales):**

- 35 ratas de la raza Holtzman de género femenino nulíparas, de 2 meses de edad al inicio del proyecto, obtenidas en el Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia; estas fueron manipuladas tomando como base la ([Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010](#)).

### **3.1.2. Material de laboratorio**

- Vasos de precipitación (beakers) de 5 mL, 10 mL y 100 mL; probetas de 100 mL y 1000 mL; baguetas.
- Frascos de 4 L.

### **3.1.3. Material diverso**

- Cilindro transparente de acrílico para realizar el test de nado forzado (20 cm de diámetro x 40 cm de altura) (Figura 2).
- *Open field* de acrílico negro para realizar el *open field test* (60 cm de altura x 60 cm de lado) (Figura 2).
- Jaulas metálicas y plásticas, y bebederos para roedores.
- Cámara videograbadora y CDs para el registro de los comportamientos de los animales de experimentación en el test de nado forzado (FST) y *open field test* (OFT).
- Jeringas de 1 mL y sonda orogástrica metálica para administración de soluciones por vía oral (Figura 3).
- Alimento para roedores: Engorde Purina, camote, ratonina.

### **3.1.4. Reactivos**

- NaCl.
- Agua destilada.
- Etanol (alcohol etílico) de 96°.
- Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Polisorbato 80 (Tween 80).

### **3.1.5. Equipos e instrumentos**

- Balanza y balanza analítica.
- Calentador con agitador magnético (*stirrer*).
- Agitador horizontal.
- Micropipetas de 10, 100 y 1000  $\mu$ L.



(a)



(b)

**Figura 1.** Árbol de *A. colubrina* en el bosque primario del centro poblado Las Juntas, San Ignacio, Cajamarca (a) del cual se tomaron muestras de la corteza (b)



**Figura 2.** Cilindro del FST y *open field* del OFT



**Figura 3.** Jeringa de 1 mL y sonda orogástrica metálica para la administración de soluciones por vía oral (*gavage*)

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Primera fase: Preparación de los extractos etanólicos de la corteza (EEC) de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”**

#### **a. Obtención del EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”**

Se colectaron muestras de corteza de *A. colubrina* porque en la medicina popular se usa esta estructura para tratar varios tipos de dolor e inflamación (Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013), uso corroborado por el estudio de (Santos et al, 2013). Las muestras colectadas se sometieron a un proceso de secado al aire bajo sombra durante 14 días, y se eliminaron las partes contaminadas. En el día 15 las muestras fueron cortadas y molidas finamente. Los extractos fueron obtenidos mediante modificaciones de los métodos de extracción descritos por (Kondeti et al, 2010) y (Olaleye et al, 2013) para la obtención de los extractos etanólicos de la corteza de diversas fabáceas. Brevemente, el producto de la molienda fue pesado y sometido a una maceración en agitación durante 48 horas utilizando etanol (alcohol etílico) de 96° como solvente (100 g de corteza : 200 mL de solvente), repitiendo el procedimiento hasta la pérdida de color del solvente. Después de la maceración, el extracto crudo fue filtrado y concentrado mediante evaporación utilizando una caja adaptada con un foco rojo a manera de estufa hasta la eliminación completa del solvente. El producto seco fue pesado y mantenido en frascos color ámbar hasta su utilización.

### **b. Pruebas de selección de solvente para el EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”**

Al momento de su utilización los extractos se disolvieron en vehículo, por lo que previamente se seleccionó un vehículo apropiado para realizar esta disolución. En este aspecto, si bien existen algunos estudios previos que evalúan las propiedades medicinales de *A. colubrina*, este es el primer trabajo que utiliza el extracto etanólico de la corteza (EEC) de esta especie dado que los estudios anteriores utilizaron los extractos acuoso o hidroalcohólico de esta estructura, por lo que no existen reportes acerca de qué solventes emplear para disolver el EEC. En este sentido, los tres solventes probados se seleccionaron entre diferentes excipientes comúnmente utilizados en estudios preclínicos, y fueron usados en diferentes concentraciones: etanol (alcohol etílico) de 96°, dimetilsulfóxido (DMSO), y Polisorbato 80 (Tween 80).

Los extractos fueron almacenados en refrigeración, y administrados durante el desarrollo del proyecto.

### **3.2.2. Segunda fase: Evaluación de la actividad antidepresiva del extracto etanólico de la corteza (EEC) de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”**

La tercera fase (fase experimental) se realizó en su totalidad en el Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento (LABNEURO) de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de Ciencia y Tecnología (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Lima, Perú.

Se utilizaron 35 ratas de raza Holtzman de género femenino nulíparas, de aproximadamente 2 meses de edad al inicio del estudio (120-170 g de peso), las cuales fueron mantenidas en el bioterio del LABNEURO (Anexo 5).

Los animales fueron divididos en siete grupos de 5 individuos cada uno (5 animales/grupo), y cada grupo recibió un tratamiento diferente como se muestra más adelante.

Durante siete días, las unidades experimentales fueron sometidas a un período de aclimatación, con acceso a comida y agua *ad libitum* (hasta la saciedad) (Heinrichs y Koob, 2006). La colonia fue mantenida en un ambiente con un ciclo regular luz/oscuridad controlado (luces encendidas desde las 10:00 hasta las 18:00 horas), con una temperatura controlada de aproximadamente 22°C (Cryan et al, 2005b). Debe indicarse que cualquier disturbio del ambiente de la colonia durante el período de aclimatación necesita de un nuevo período de aclimatación de siete días antes de la experimentación.

Además de eso, los animales fueron manipulados durante el período de aclimatación con la intención de evitar el desarrollo de estrés durante la manipulación en la fase experimental, asegurando mediciones basales “sin estrés” reproducibles y bajas (Heinrichs y Koob, 2006).

**a. Prueba de toxicidad aguda del EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”**

Se realizó antes del inicio de los tratamientos agudos y crónicos. Esta prueba implicó una modificación del Procedimiento de Dosis Fija (*Fixed Dose Procedure*, FDP), y

permitió evaluar la toxicidad aguda de las dosis previamente seleccionadas para el presente estudio administradas por vía oral (*per os*, p.o.) utilizando una sonda orogástrica metálica (*gavage*). Las dosis de EEC seleccionadas fueron 50, 100 y 200 mg/kg, similares a las empleadas en el estudio de (Santos et al, 2013), aunque haciendo notar que el grupo de Santos empleó el extracto acuoso de la corteza, mientras nosotros utilizamos el extracto etanólico de la misma.

El Procedimiento de Dosis Fija (Botham, 2004; Lipnick et al, 1995) es una variante de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) que consiste en elegir varias dosis del tratamiento en evaluación y administrarlas en los animales de experimentación, registrando durante un período de tiempo determinado (hasta 48 horas) la reacción de los animales frente al tratamiento administrado. Este protocolo tiene la ventaja de utilizar un menor número de animales de experimentación que la  $DL_{50}$ , además de reducir notablemente el sufrimiento innecesario y muerte de estos, dado que no se busca determinar la letalidad de los tratamientos sino su toxicidad.

Para la prueba utilizamos 5 animales, a los cuales se les retiró la comida y el agua desde las 10:00 horas para poder observar más claramente el efecto del extracto. Los animales de experimentación fueron pesados y el EEC fue administrado por vía oral.

Para este fin, se consideraron tres grupos de uno o dos animales cada uno (cinco animales en total), divididos de la siguiente manera: Toxicidad aguda de los extractos etanólicos de la corteza: TC1: 50 mg/kg; TC2: 100 mg/kg; TC3: 200

mg/kg. Los animales fueron observados durante 48 horas para detectar cualquier señal de toxicidad (salivación, lacrimación, rinorrea, ptosis, temblores, convulsiones, respiración incrementada), estrés (erección del pelo) o cambios en el comportamiento (movimientos espontáneos, saltos, limpieza excesiva de la cara, acicalamiento, hiperactividad, sedación). Esta observación se realizó continuamente durante las primeras 4 horas para registrar cualquier cambio comportamental o mortalidad, y de forma intermitente durante las siguientes 6 horas; posteriormente fueron observados 24 y 48 horas después de la administración de los extractos (Suresh et al, 2009). Este estudio previo sirvió para seleccionar las dosis finales de los extractos a ser utilizadas en la siguiente fase del proyecto (Selección o *Screening*).

## **b. Tratamientos experimentales**

Los tratamientos experimentales fueron administrados en dos regímenes, agudo y crónico; cada tratamiento fue aplicado entre las sesiones de habituación y prueba del test de nado forzado (FST).

**b.1 Tratamiento 1 (T1) – Selección de una dosis no efectiva / subefectiva en la administración oral aguda del EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo” (*Screening*) (1 día)** (EEC: 50; 100; 200 mg/kg/día; 5 animales/dosis)

El **grupo T1** (15 animales) recibió un tratamiento agudo (una sola aplicación) con el EEC + vehículo. Sirvió para evaluar el efecto de los EEC de *Anadenanthera colubrina* a

tres diferentes dosis (50; 100; 200 mg/kg) en una versión aguda del FST realizada en dos días consecutivos. Adicionalmente, esta selección o *screening* permitió escoger la dosis no efectiva más alta o la dosis subefectiva más baja de los extractos etanólicos en el FST, entendiéndose como (a) **dosis no efectiva** aquella dosis que no muestra ningún tipo de mejoría respecto al grupo Control, y como (b) **dosis subefectiva** aquella dosis que muestra una mejoría respecto al grupo Control, pero una mejoría que no resulta estadísticamente significativa.

El **grupo T1** fue dividido en 3 subgrupos de 5 animales cada uno, los cuales recibieron los tratamientos en las dosis antes descritas; la dosis seleccionada en T1 fue utilizada en el Tratamiento 2 (T2).

**b.2 Tratamiento 2 (T2) – Administración oral crónica del EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo” (18 días)** (EEC: Dosis seleccionada; 5 animales/dosis)

El **grupo T2** (5 animales) recibió un tratamiento crónico (18 días) con el EEC + vehículo, y sirvió para evaluar el efecto de la administración crónica (18 días) del extracto en la dosis seleccionada en el Tratamiento 1 del FST.

**b.3 Tratamiento 0 (T0) – Grupos Control:** Administración oral aguda (Control 1, 1 día) / crónica (Control 2, 18 días) de vehículo (10 animales)

El **grupo T0** (10 animales) recibió una dosis de vehículo, por vía oral durante 1 día (**Control 1 - Agudo**, 5 animales) o durante 18 días (**Control 2 – Crónico**, 5 animales).

**c. Modelo animal predictivo de actividad antidepresiva:  
Test de Nado Forzado (*Forced Swimming Test*, FST)**

**c.1 Sesión de Habitación** (día 1) (Cryan et al, 2005b; Porsolt et al, 2001)

Se colocaron los animales en el cuarto experimental y se les retiró la comida y el agua 60 minutos antes del inicio de la sesión de habitación. Los animales fueron asignados aleatoriamente a un tratamiento, pero todos los animales en una misma jaula recibieron el mismo tratamiento.

Para esto, se empleó un cilindro transparente de acrílico (20 cm de diámetro x 40 cm de altura), conteniendo agua a 37-38°C a una altura de 30 cm (Cryan et al, 2005b; Detke y Lucki, 1996; Detke et al, 1995). Un animal fue pesado y colocado en el cilindro por un período de 15 minutos. No se registró el tiempo de inmovilización de los animales durante este período, dado que éste sirve para habituar a las ratas a la situación experimental e inducir un nivel alto y estable de inmovilidad durante el test real (Cryan et al, 2005b; Porsolt et al, 2001). Todos los individuos realizaron el FST, tanto en la sesión de habitación como en la sesión experimental. El agua de los cilindros fue cambiada después de cada dos ratas.

Los animales fueron retirados de los cilindros, secados con una toalla, y colocados en una jaula.

Cuando se concluyó la sesión, las ratas fueron llevadas a la colonia donde fueron provistas de agua y comida *ad libitum*.

**c.2 Administración de los EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”** (Tratamiento agudo: día 2 / Tratamiento crónico: Día 2 a 19)

Los extractos fueron administrados en el cuarto experimental de acuerdo a los grupos antes determinados.

Los individuos de los grupos **T1** y **T2** recibieron los extractos de *A. colubrina* p.o. Los animales de experimentación pertenecientes a **T0** recibieron su respectivo vehículo p.o. Se debe hacer notar que los tratamientos agudos se realizaron al **siguiente día (día 2) de la sesión de habituación (Grupo T1 y Control 1)**, mientras que los tratamientos crónicos se realizaron en los siguientes 18 días (entre los **días 2 y 19**) **a partir de la sesión de habituación (Grupo T2 y Control 2)**.

Entre los días de tratamiento con los extractos, los animales de los grupos experimentales (excepto el **Grupo T1 y Control 1**) fueron devueltos a la colonia y tuvieron a disposición agua y comida *ad libitum*, excepto en el día de la sesión de prueba, en el cual ambos fueron retirados.

**c.3 Sesión de Prueba** (Tratamiento agudo: día 2 / Tratamiento crónico: día 19)

Después de 60 minutos (Tratamiento agudo), o de 18 días (Tratamiento crónico) de tratamiento con los extractos etanólicos de *A. colubrina*, se llevó a cabo la segunda prueba durante 5 minutos, registrando los comportamientos a ser medidos a través de una cámara videograbadora para su posterior análisis ([Cryan et al, 2005b](#)).

Los comportamientos medidos seleccionados en el FST modificado fueron: (1) comportamiento de “escalamiento”, definido como movimientos hacia arriba de las patas delanteras, usualmente a lo largo de la cara lateral de la cámara de nado; (2) comportamiento de nado, definido como un movimiento (usualmente horizontal) a través de la cámara de nado, el cual incluye cruzar a través de cuadrantes del cilindro; y (3) inmovilidad, medida cuando no se observa ninguna actividad adicional más que la requerida para mantener la cabeza del animal por encima del agua (Cryan et al, 2005b).

Los animales de experimentación fueron llevados al cuarto experimental, y un animal fue colocado en el cilindro, de modo similar a lo realizado en la Sesión de habituación. Sin embargo, esta vez se observó el comportamiento de los animales por un lapso de 5 minutos, registrando la frecuencia de los comportamientos antes descritos, mediante la técnica de muestreo del comportamiento (Detke et al, 1995). Esta función fue realizada por el mismo observador con la finalidad de evitar posibles errores de interpretación por personas distintas.

#### **c.4 Registro de datos mediante la técnica de muestreo**

El cómputo de comportamientos registrados en la cámara videogradora mediante la técnica del muestreo (también llamada *sampling*) consiste en contabilizar únicamente los comportamientos predominantes durante la sesión de prueba de 5 minutos en intervalos de 5 segundos, de modo que al finalizar la sesión de prueba se han

contabilizado 60 comportamientos. Esta técnica fue descrita por primera vez para el FST por (Detke et al, 1995), y muchos estudios la han empleado con resultados confiables (Cryan et al, 2005a; Detke y Lucki, 1996, Detke et al, 1997); por este motivo, hicimos uso de esta técnica en el presente trabajo de investigación.

#### **d. Modelo animal de evaluación de la actividad locomotora: *Open Field Test* (OFT)**

Se continuó con el test hasta acabar con la totalidad de animales; 4 horas después de terminar el ensayo, los animales de experimentación fueron sometidos al *open field test* (OFT) para evaluar sus niveles de actividad locomotora. En este caso, el OFT consistió en una modificación de los protocolos descritos por (Crawley, 1985; Prut y Belzung, 2003; Ribeiro et al, 2006). El test se realizó varias horas después de finalizar el FST para permitir que los animales se recuperen físicamente del desgaste físico en el cilindro de nado, y permitió determinar si un mayor comportamiento de nado/movilidad en el FST se debía a un probable efecto antidepresivo del extracto etanólico de *A. colubrina*, o a un aumento en la actividad locomotora producido por dicho extracto. El comportamiento a medirse en el OFT fue el número de veces que los animales de experimentación cruzaron cada uno de los cuatro cuadrantes en los que está dividido el *open field* en un lapso de tiempo de 2 minutos (Prut y Belzung, 2003), considerando que un mayor número de cruces indica un aumento en la actividad locomotora, mientras que una disminución en el número de cruces indica una reducción en la locomoción general.

### **e. Diseño experimental y análisis estadísticos**

En el presente proyecto se utilizaron varios tipos de diseños experimentales, dependiendo del test en evaluación (test de nado forzado, FST, u *open field test*, OFT) y la duración de los tratamientos:

Diseño de 4 x 5: Se empleó para la evaluación de comportamientos en los tratamientos agudos del test de nado forzado (FST), en donde 4 representa el número de tratamientos utilizados (Control + 3 dosis del EEC de *Anadenanthera colubrina*) y 5 representa el número de repeticiones por grupo (n = 5 animales/grupo).

Diseño de 2 x 5: Se empleó para la evaluación de los comportamientos en los tratamientos crónicos del test de nado forzado (FST), en donde 2 representa el número de tratamientos utilizados (Control + 1 dosis seleccionada del EEC de *A. colubrina*) y 5 representa el número de repeticiones por grupo (n = 5 animales/grupo).

ANAVA de 2 factores (2 x 2 x 5): Se empleó este diseño para la comparación de los tratamientos agudos y crónicos con el EEC de *A. colubrina*, en donde 2 representa el número de tratamientos utilizados (Control + 1 dosis del EEC de *Anadenanthera colubrina*, repetidas en los tratamientos agudos y crónicos), 2 representa el número de regímenes (Agudo y Crónico) y 5 representa el número de repeticiones por grupo (n = 5 animales/grupo).

Diseño de una vía o completamente al azar: Este diseño de estudio se empleó tanto para los tratamientos agudos como

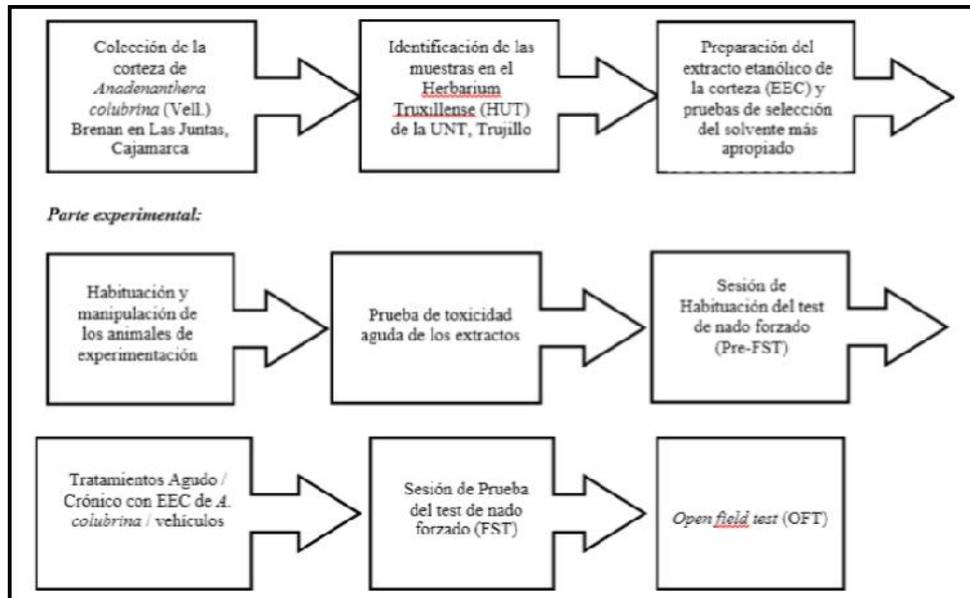
crónicos en el *open field test* (OFT), en donde se evaluó un solo comportamiento (número de cruces de cuadrantes en el *open field*) de acuerdo con los tratamientos aplicados tanto aguda (Control + 3 dosis del EEC de *A. colubrina*) como crónicamente (Control + 1 sola dosis del EEC de *A. colubrina*), con 5 repeticiones por grupo (n = 5 animales/grupo).

NOTA: En los diseños experimentales no se consideran los 5 animales de experimentación utilizados para la evaluación de la toxicidad aguda de los extractos etanólicos de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”.

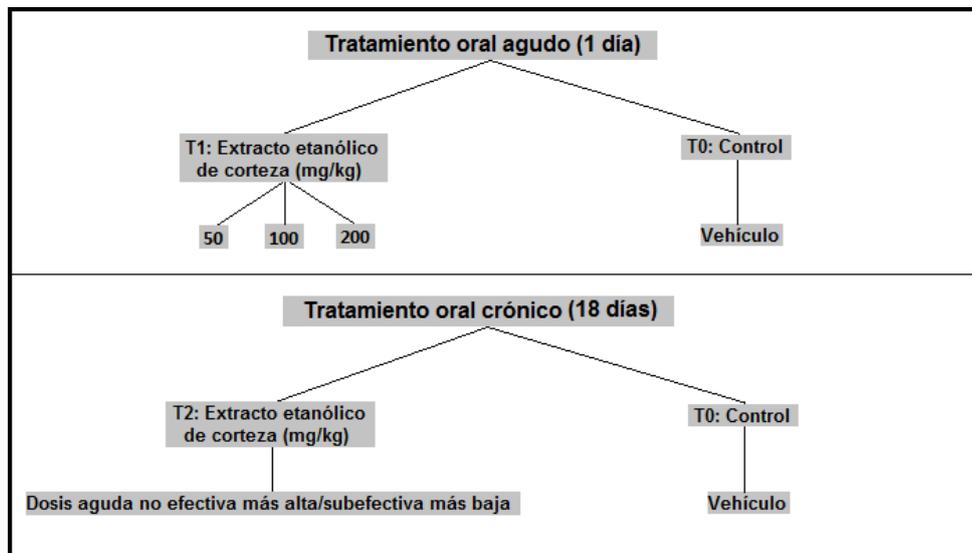
Aunque inicialmente se había considerado utilizar el Análisis de varianza (ANAVA) como prueba estadística en este trabajo de investigación, dada la naturaleza del estudio y el tipo de registro de datos se consideró más apropiado emplear una prueba no paramétrica, la prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney (también llamada U de Mann/Whitney). En la sección de Discusión se trata más ampliamente el por qué se utilizó este procedimiento en el análisis de los datos obtenidos en el estudio.

#### **f. Tratamientos en estudio**

El flujograma y sistema de tratamientos en el presente trabajo se muestran en la Figura 4.



(a)



(b)

**Figura 4.** (a) Flujograma del desarrollo del trabajo, y (b) Esquema de los tratamientos orales agudos y crónicos con el EEC de *A. colubrina*

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Primera fase: Preparación de los extractos etanólicos de la corteza (EEC) de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”

#### 4.1.1 Obtención del EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”

- La molienda de las muestras de corteza secas fue realizada manualmente, primero trozando las muestras y posteriormente utilizando un molinillo para obtener un polvo fino que pueda ser sometido al proceso de maceración.
- Las muestras colectadas fueron pesadas antes y después de la molienda, obteniéndose los siguientes registros:

#### Peso ANTES y DESPUÉS de la Molienda:

Aproximadamente 1800 g

- Después de la molienda el producto fue sometido a un proceso de maceración utilizando etanol (alcohol etílico) de 96° como solvente. La maceración se realizó durante 48 horas en agitación, realizándose varios lavados hasta la pérdida del color del macerado (Figura 5).
- El macerado fue realizado utilizando los componentes en una proporción 1:2 (peso molido en g : volumen etanol de 96° en mL) y utilizando solamente 1400 g del producto de la molienda (el restante quedó como reserva); el proceso de macerado fue llevado a cabo en dos lotes:

Lote 1: Aprox. 300 g + aprox. 600 mL etanol 96° (por lavado); se realizaron 6 lavados.

Lote 2: Aprox. 1100 g + aprox. 2200 mL etanol 96° (por lavado); se realizaron 4 lavados.

- El macerado (extracto crudo) fue filtrado y concentrado durante un período aproximado de 3 meses en frascos abiertos forrados con papel celofán rojo dentro de una caja cerrada recubierta parcialmente con tecnopor, con un foco rojo en el centro de la caja, hasta la completa evaporación del solvente.
- El producto seco resultante de la concentración fue pesado, obteniéndose aproximadamente 290 g de un compuesto sólido de una coloración marrón-rojizo (extracto etanólico de la corteza, EEC de *Anadenanthera colubrina*, Figura 6), con un porcentaje de rendimiento de 20,7%; el porcentaje de rendimiento se obtuvo de la siguiente manera:

**Peso de la masa seca:** Aprox. 290 g

→ **Porcentaje de rendimiento:** Molido = 1400 g; Masa seca = 290 g

**% Rendimiento = Aprox. 20,7%**



(a)



(b)

**Figura 5.** Maceración: (a) Elementos utilizados: frasco color ámbar, producto de la molienda y etanol (alcohol etílico) 96°; (b) Mezcla de los elementos antes del proceso de macerado



**Figura 6.** Extracto etanólico de la corteza (EEC) de *A. colubrina* (Vell.)  
Brenan “vilca” o “huayo”

#### 4.1.2 Pruebas de selección de solvente para el EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”

Se debe remarcar que antes de emplear solventes, se probó disolver el EEC utilizando solución salina (s.s.) al 0,9% tibia, pero este no mostró ningún tipo de solubilidad en dicho disolvente.

##### **Pruebas de dilución utilizando etanol (alcohol etílico) de 96°:**

– Se probó disolver 1 g de EEC en tres muestras:

- (1) Disolución 1: 5 mL de etanol 96°;
- (2) Disolución 2: 10 mL de etanol 96°; y
- (3) Disolución 3: 15 mL de etanol 96°;

En todos los casos se empleó primero agitación manual y posteriormente un agitador horizontal durante 120 minutos a 100 rpm.

– Las muestras (1) y (2) precipitaron, con más notoriedad en la prueba (1), mientras que la muestra (3) no precipitó casi nada.

– Se observó que si se agrega agua a la disolución y se deja reposar por unos minutos la mezcla flocula; en ese caso es mejor preparar la disolución inmediatamente antes de administrar al animal de experimentación, no obstante con el paso del tiempo la solución adquiere un aspecto viscoso.

##### **Pruebas de dilución utilizando dimetilsulfóxido (DMSO):**

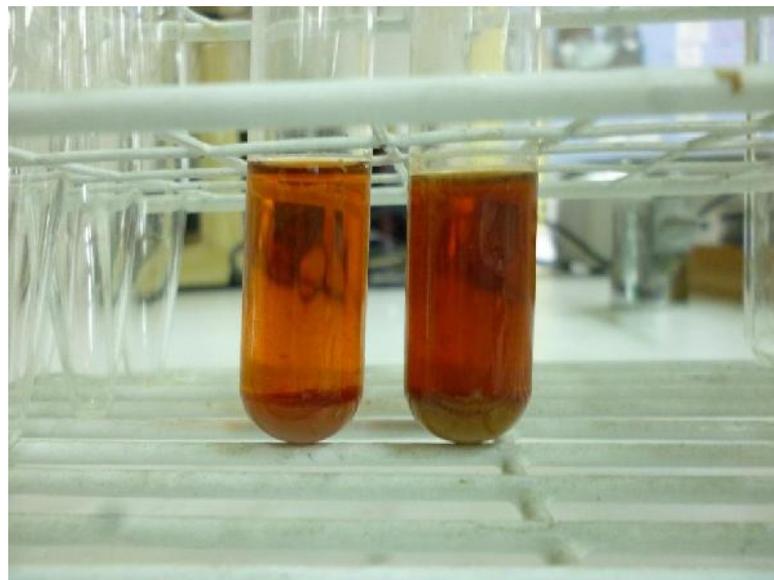
– Se trató de disolver 1 g de EEC en dos concentraciones:

- (1) Disolución 4: 10 mL de 5% de DMSO en s.s. al 0,9%, y
- (2) Disolución 5: 5 mL de 10% de DMSO en s.s. al 0,9%.

– Ninguna de las concentraciones empleadas sirvió para disolver completamente el extracto. De este modo, el DMSO no mostró ser un buen solvente para el EEC de *Anadenanthera colubrina*.

### **Pruebas de dilución utilizando Polisorbato 80 (Tween 80):**

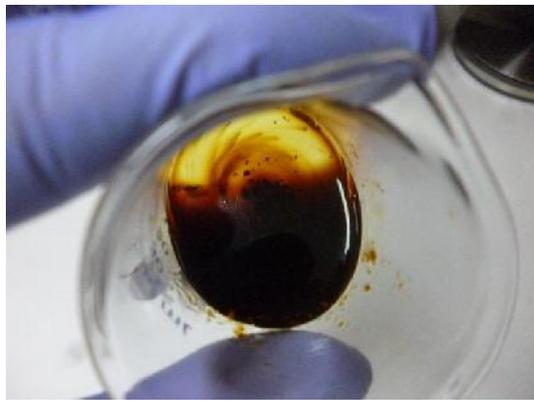
- Se trató de disolver 1 g de EEC en varias concentraciones:
  - (1) Disolución 6: Pequeños volúmenes de Tween 80 + agua destilada;
  - (2) Disolución 7: 40 mL de 5% de Tween 80 en agua destilada;
  - (3) Disolución 8: 10 mL de 10% de Tween 80 en agua destilada;
  - (4) Disolución 9: 5 mL de 10% de Tween 80 en s.s. al 0,9%;
  - (5) Disolución 10: 10 mL de 10% de Tween 80 en s.s. al 0,9%;
  - (6) Disolución 11: 20 mL de 10% de Tween 80 en s.s. al 0,9%
- Cada una de estas mezclas fue preparada de la manera que fue considerada más apropiada, es decir mediante una mezcla manual, utilizando un agitador horizontal o usando un agitador magnético.
- De todas estas disoluciones, la que mejor disolvió el EEC de *Anadenanthera colubrina* fue la 11. Las disoluciones 6, 7, 9, y 10 no lograron disolver el EEC, mientras que la disolución 8 llegó a disolver el extracto pero con el tiempo la solución se hizo viscosa, por lo que fue descartada.
- De la comparación de los diferentes productos de solubilidad, corroboramos que 10% de Tween 80 en s.s. al 0,9% fue el mejor solvente para el EEC de *Anadenanthera colubrina* (Figuras 7 y 8), por lo que en adelante se le llamará **vehículo**.



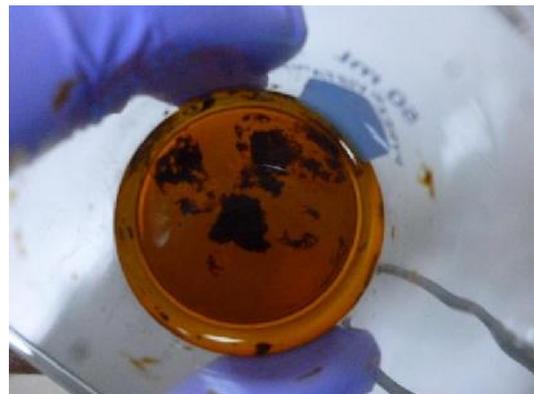
**Figura 7.** Pruebas de dilución del EEC de *A. colubrina* empleando s.s. 0,9% y etanol 96°



(a)



(b)



(c)

**Figura 8.** Pruebas de dilución del EEC de *A. colubrina* empleando (a) Tween 80, (b) Etanol 96°, y (c) DMSO

#### **4.2. Segunda fase: Evaluación de la actividad antidepresiva del extracto etanólico de la corteza (EEC) de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”**

- Antes de la evaluación de la actividad antidepresiva del EEC de *Anadenanthera colubrina*, se procedió a realizar una pre-prueba del test de nado forzado (FST) para corroborar la altura del agua en el test descrita por (Detke y Lucki, 1996) y (Detke et al, 1995).
- Se utilizó una rata de aproximadamente 245-250 g (Figura 9), probándose 2 alturas de agua: (1) 22 cm, y (2) 29 cm. Se observó que con 22 cm de altura la rata podía quedarse parada en una de sus patas posteriores, por lo que no necesitaba nadar. Posteriormente, se observó que al usar 29 cm de agua la rata no tiene posibilidad de ponerse en pie sobre la base del cilindro, por lo que consideramos recomendable usar entre 27 y 30 cm de altura de agua, de los cuales 1,5 L son de agua recién hervida. Adicionalmente, pudimos apreciar que la temperatura del agua se mantuvo durante un buen tiempo (mayor a 30 minutos).
- Dos días después de esta pre-prueba, fueron recibidas del bioterio del LID de la UPCH 35 ratas Holtzman hembras nulíparas de entre 2 y 3 meses de edad, las cuales fueron agrupadas aleatoriamente en conjuntos de 5 ratas/jaula (Figura 10) y pesadas para su registro, el cual volvió a ser realizado 10 días después (Tablas 1 y 2). Los animales fueron mantenidos en un ciclo regular luz/oscuridad controlado (las luces encendidas desde las 10:00 horas hasta las 18:00 horas), y manipuladas entre 5 y 10 minutos diarios durante 14 días para asegurar una mayor interacción entre el experimentador y los animales, y un bajo nivel basal de estrés, además de proveerles comida y agua de grifo *ad libitum* y cambiarles de cama diaria/interdiariamente, de acuerdo con lo requerido.



**Figura 9.** Pre-prueba del FST para la determinación de la altura del agua en el test



**Figura 10.** Ratas Holtzman hembras nulíparas (2 a 3 meses de edad) utilizadas como unidades experimentales en el estudio

**Tabla 1. Registro del peso de las unidades experimentales a su llegada al bioterio del Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento (LABNEURO)**

<b>Jaula</b>	<b>Rata 1</b>	<b>Rata 2</b>	<b>Rata 3</b>	<b>Rata 4</b>	<b>Rata 5</b>
<b>Jaula 1</b>	170 g	132 g	130 g	144 g	152 g
<b>Jaula 2</b>	158 g	142 g	150 g	170 g	142 g
<b>Jaula 3</b>	150 g	142 g	134 g	150 g	140 g
<b>Jaula 4</b>	140 g	128 g	138 g	158 g	138 g
<b>Jaula 5</b>	138 g	150 g	130 g	140 g	152 g
<b>Jaula 6</b>	156 g	148 g	138 g	156 g	150 g
<b>Jaula 7</b>	152 g	140 g	134 g	160 g	154 g

**Tabla 2. Registro del peso de las unidades experimentales 10 días después de su llegada**

<b>Jaula</b>	<b>Rata 1</b>	<b>Rata 2</b>	<b>Rata 3</b>	<b>Rata 4</b>	<b>Rata 5</b>
<b>Jaula 1</b>	202 g	180 g	178 g	200 g	190 g
<b>Jaula 2</b>	184 g	172 g	174 g	200 g	182 g
<b>Jaula 3</b>	198 g	186 g	162 g	186 g	192 g
<b>Jaula 4</b>	182 g	164 g	184 g	178 g	174 g
<b>Jaula 5</b>	188 g	190 g	170 g	176 g	186 g
<b>Jaula 6</b>	194 g	178 g	188 g	188 g	180 g
<b>Jaula 7</b>	180 g	178 g	162 g	186 g	176 g

#### 4.2.1 Prueba de toxicidad aguda del EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo”

- Para la prueba utilizamos 5 animales, los cuales fueron pesados y el EEC, después de ser cargado en las jeringas, fue administrado por vía oral de acuerdo con lo mostrado en los Anexos 6 y 10.
- No observamos signos de intoxicación con ninguno de los animales utilizados en el test. El único hecho notable fue que una de las unidades experimentales (Rata 1) empezó a roer la viruta que le servía de cama poco después de la administración de los extractos, pero eso es normal cuando estos roedores ingieren soluciones desagradables, pues no tienen la capacidad de vomitar o regurgitar estas sustancias y tratan de minimizar sus efectos royendo lo que tengan a su disposición.
- Los animales también mostraron sueño algún tiempo después de la administración del EEC, pero eso es normal luego de sufrir un procedimiento que les ocasione estrés, como la administración de productos por vía oral.
- Una hora después de la administración del extracto, los animales fueron provistos con comida y agua *ad libitum*, a la vez que se les observaba para ver algún signo de toxicidad.

Luego de varios días de corroborar que el EEC de *Anadenanthera colubrina* no mostraba toxicidad aguda en ninguna de sus dosis (50; 100; 200 mg/kg), se procedió a iniciar el tratamiento agudo con los extractos y vehículo para evaluar su actividad en el FST y OFT.

4.2.2 Pruebas comportamentales: Test de nado forzado (*Forced Swimming Test*, FST) y *Open Field Test* (OFT)

**Tratamientos Agudos:**

Tratamiento 1 (T1) – Selección de una dosis no efectiva / subefectiva en la administración oral aguda del EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo” (*Screening*) (1 día)

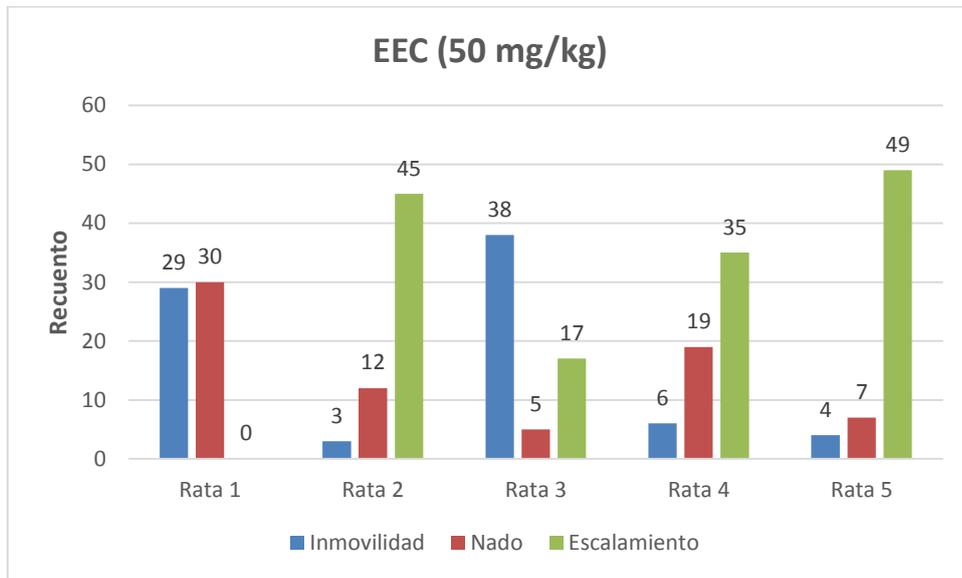
**a) 50 mg/kg:** En la sesión de prueba del FST los animales fueron pesados para determinar el volumen de EEC a ser administrado en base a su peso corporal (Anexos 7A y 10).

**b) 100 mg/kg:** En la sesión de prueba del FST los animales fueron pesados para determinar el volumen de EEC a ser administrado en base a su peso corporal (Anexos 7B y 10)

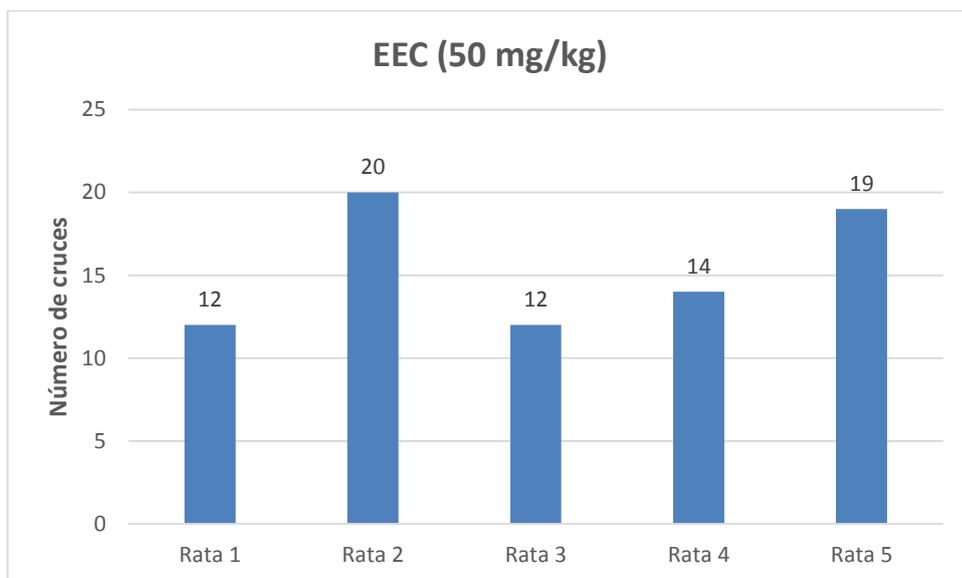
**c) 200 mg/kg:** En la sesión de prueba del FST los animales fueron pesados para determinar el volumen de EEC a ser administrado en base a su peso corporal (Anexos 7C y 10)

**Tratamiento 0 – Grupo Control 1 (T0): Administración oral aguda (1 día) de vehículo (10% de Tween 80 en s.s. 0,9%):** En la sesión de prueba del FST los animales fueron pesados para determinar el volumen de vehículo a ser administrado en base a su peso corporal (Anexos 7D y 10)

**Todos los comportamientos observados en la sesión de prueba del FST y en el OFT fueron registrados utilizando una cámara videograbadora para su posterior análisis.** Estos comportamientos se resumen en las Figuras 11 a 14 mostradas a continuación.

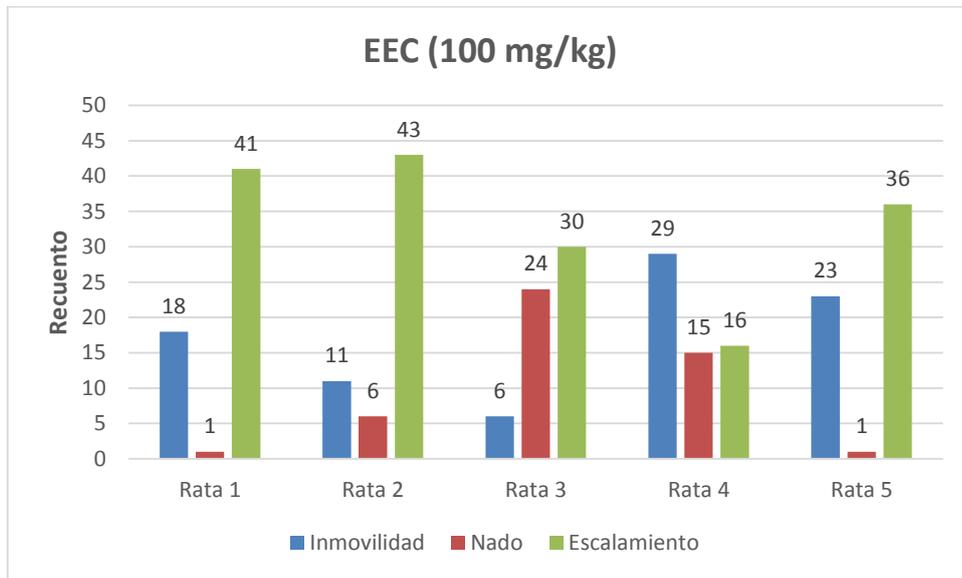


(a)

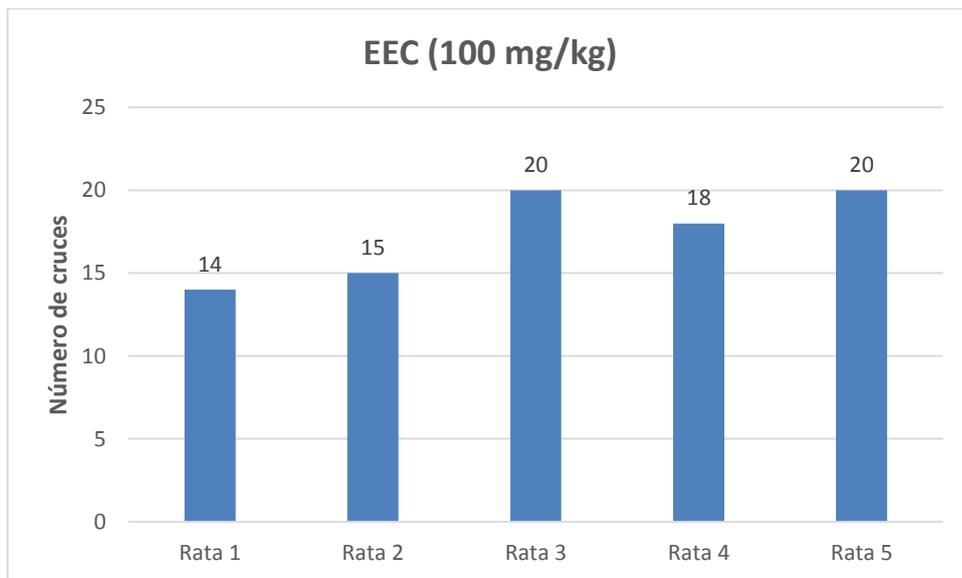


(b)

**Figura 11.** Efecto del tratamiento agudo con el EEC de *A. colubrina* (50 mg/kg) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT

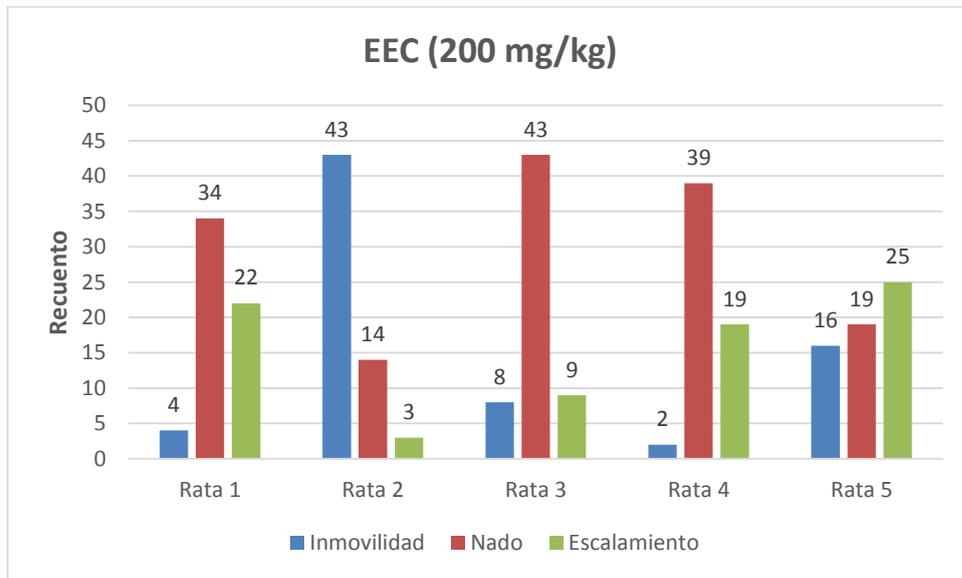


(a)

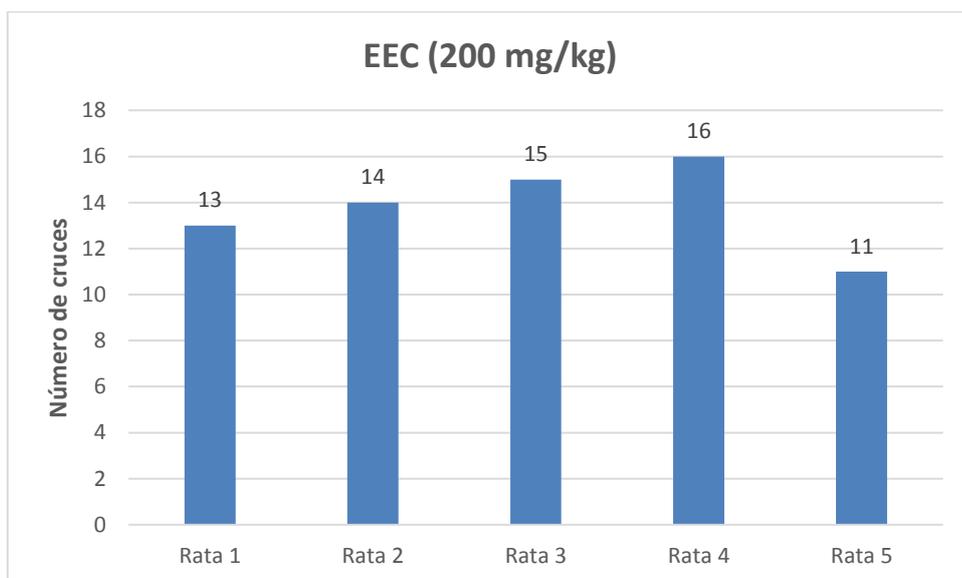


(b)

**Figura 12.** Efecto del tratamiento agudo con el EEC de *A. colubrina* (100 mg/kg) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT

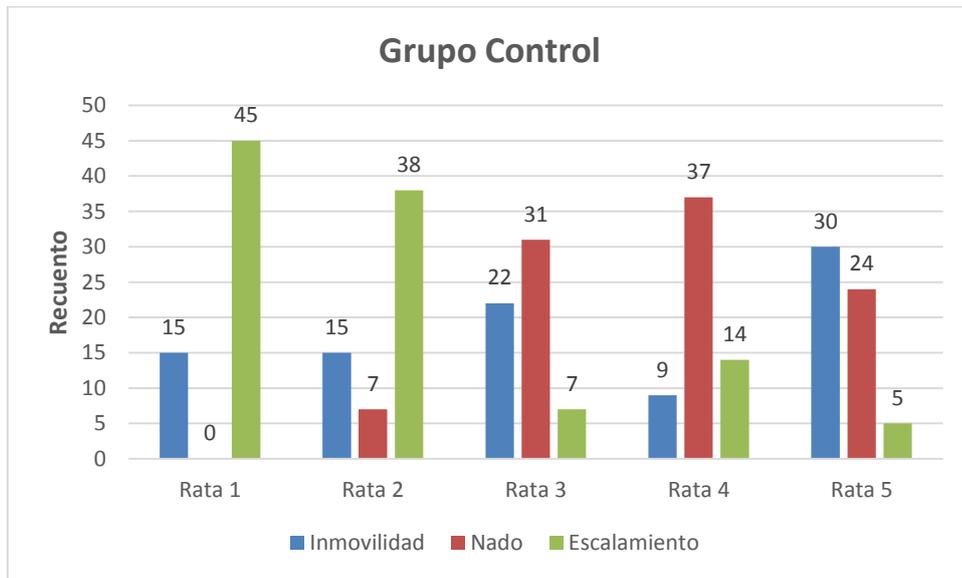


(a)

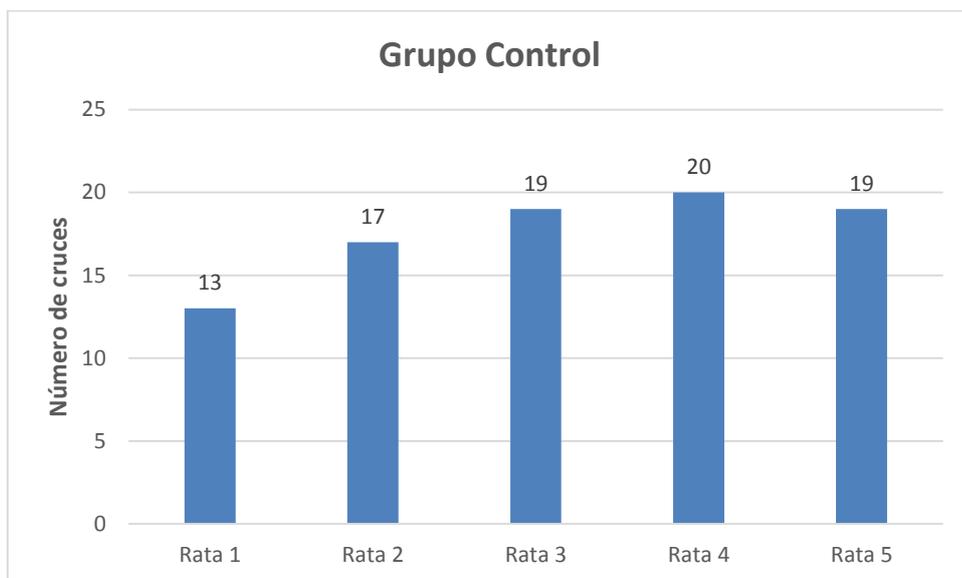


(b)

**Figura 13.** Efecto del tratamiento agudo con el EEC de *A. colubrina* (200 mg/kg) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT



(a)



(b)

**Figura 14.** Efecto del tratamiento agudo con vehículo (Grupo Control 1) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT

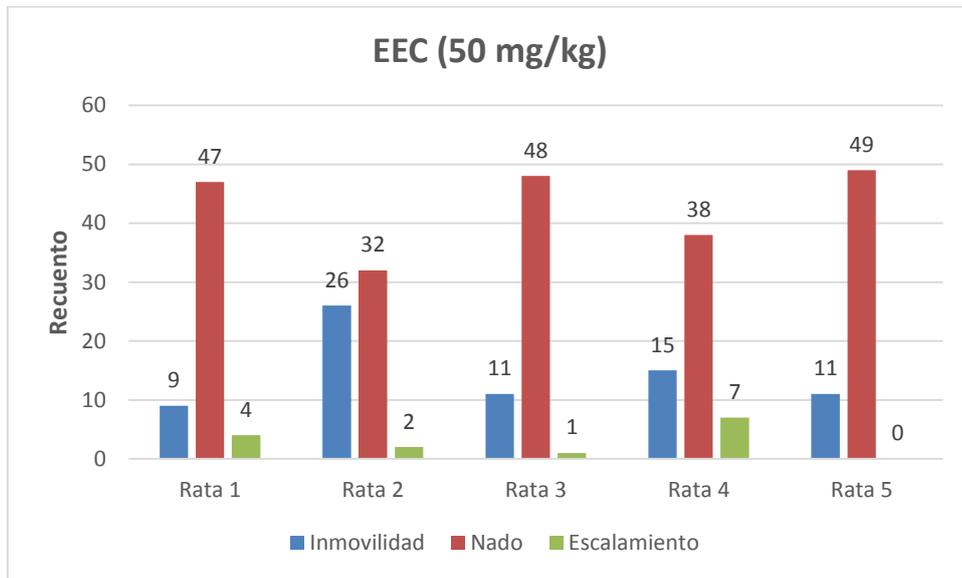
### **Tratamientos Crónicos:**

**Tratamiento 2 (T2): Administración oral crónica del EEC de *Anadenanthera colubrina* “vilca” o “huayo” (18 días) (EEC: 50 mg/kg/día):** En la sesión de prueba del FST llevada a cabo después de 17 días de tratamiento con el EEC de *A. colubrina* (Anexos 8A y 10). Los animales fueron pesados para determinar el volumen de EEC a ser administrado en base a su peso corporal (Anexos 9A y 10).

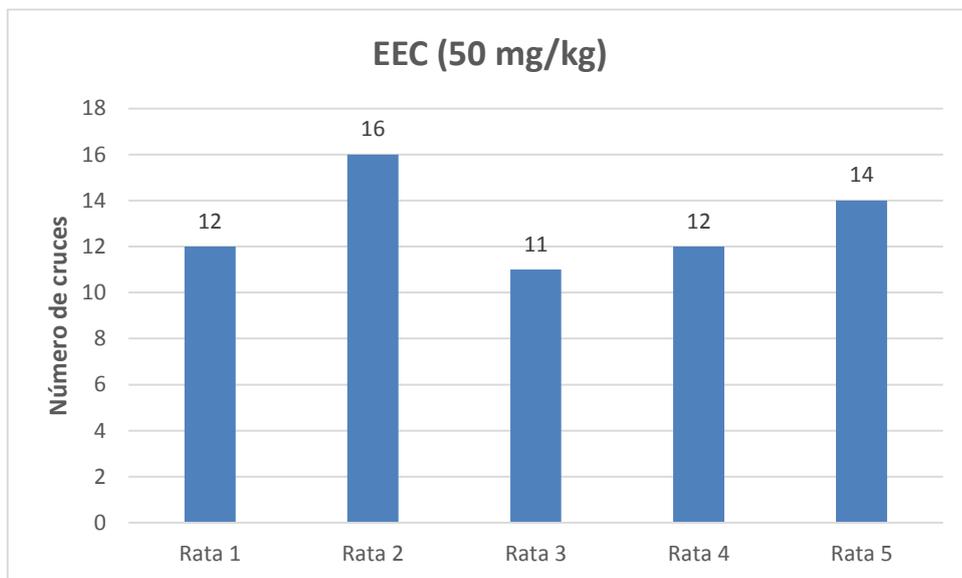
**Tratamiento 0 – Grupo Control 2 (T0): Administración oral crónica (18 días) de vehículo (10% de Tween 80 en s.s. 0,9%):** En la sesión de prueba del FST llevada a cabo después de 17 días de tratamiento con vehículo (Anexos 8B y 10). Los animales fueron pesados para determinar el volumen de vehículo a ser administrado en base a su peso corporal (Anexos 9B y 10).

**Todos los comportamientos observados en la sesión de prueba del FST y en el OFT fueron registrados utilizando una cámara videograbadora para su análisis.** Estos comportamientos se resumen en las Figuras 15 y 16 mostradas a continuación.

Asimismo, las Figuras 17 y 18 examinan el efecto de los tratamientos con el EEC de *A. colubrina* versus el grupo Control en ambos tests comparando sus medias, mientras que las Tablas 3 a 10 comparan los diferentes grupos utilizando la prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney. Para todas las comparaciones la  $H_0$  fue la igualdad entre las medias, mientras que la  $H_1$  fue la diferencia entre ellas ( $\alpha=0,05$ ).

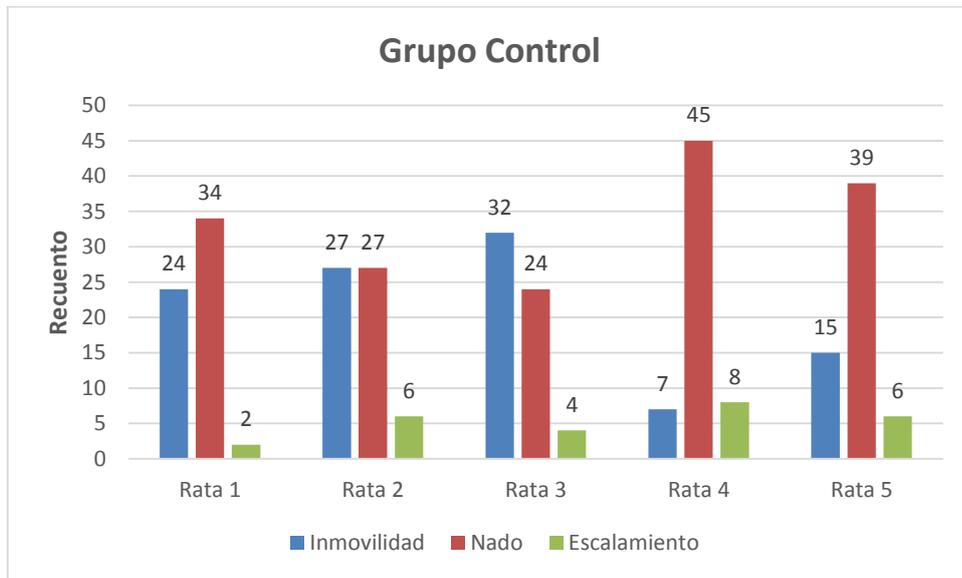


(a)

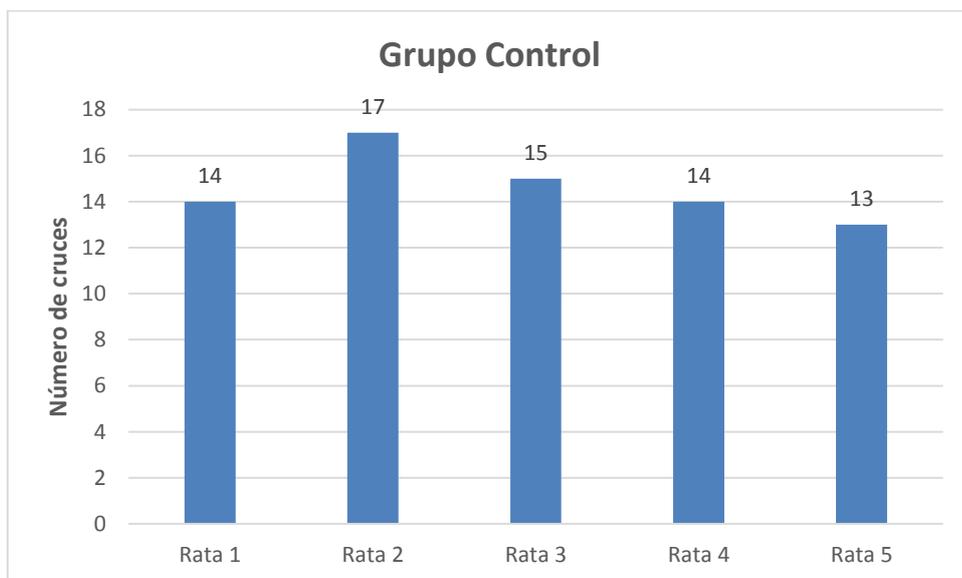


(b)

**Figura 15.** Efecto del tratamiento crónico con el EEC de *A. colubrina* (50 mg/kg) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT

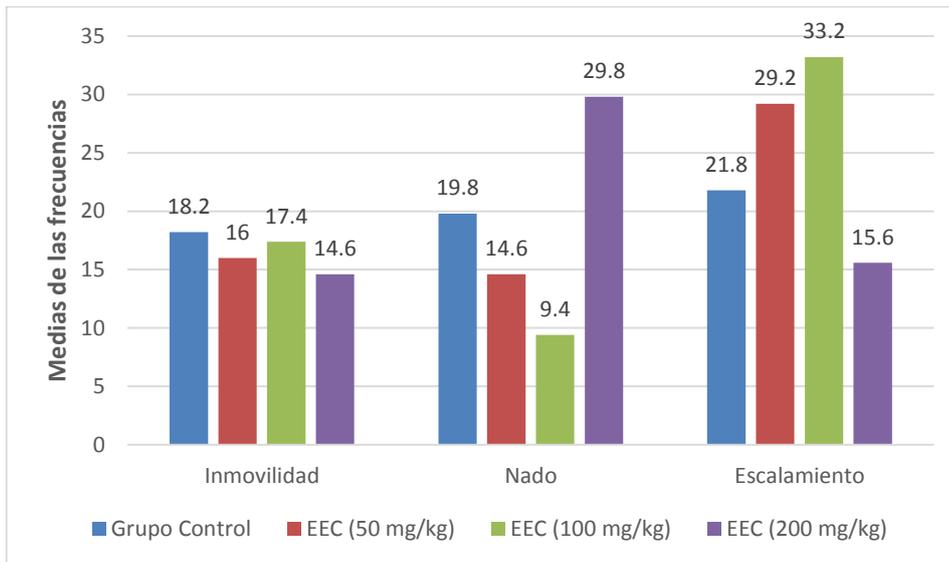


(a)

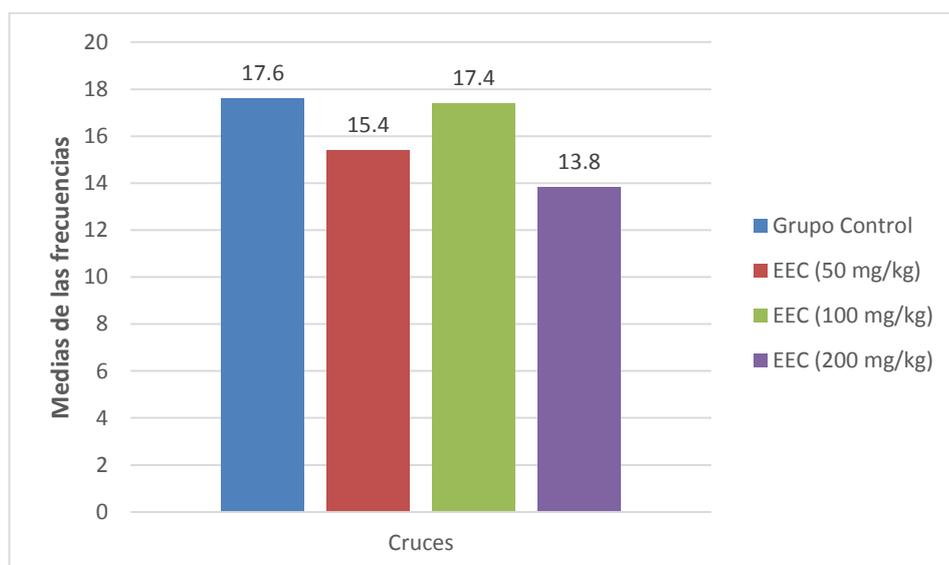


(b)

**Figura 16.** Efecto del tratamiento crónico con vehículo (Grupo Control 2) sobre (a) el recuento de comportamientos en el FST, y (b) el número de cruces en el OFT

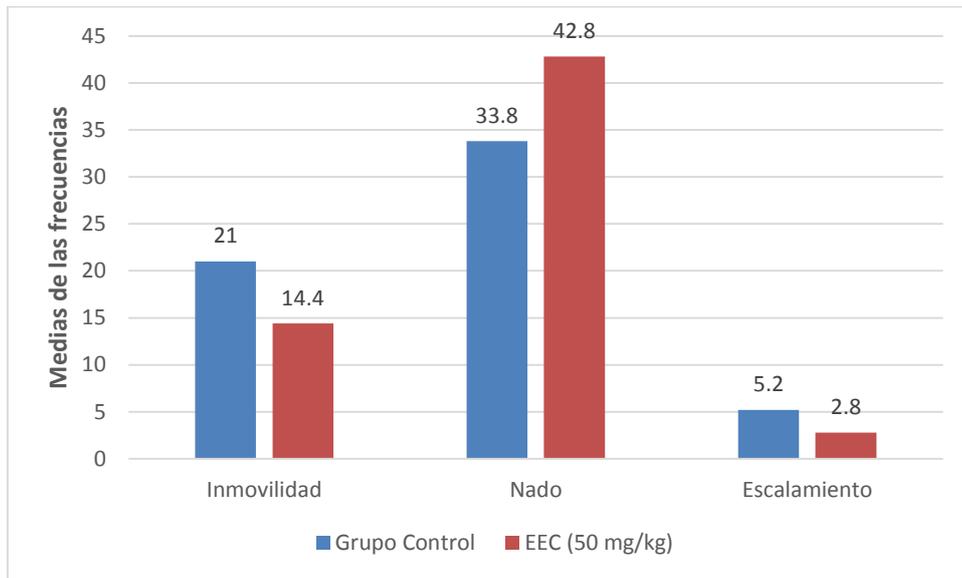


(a)

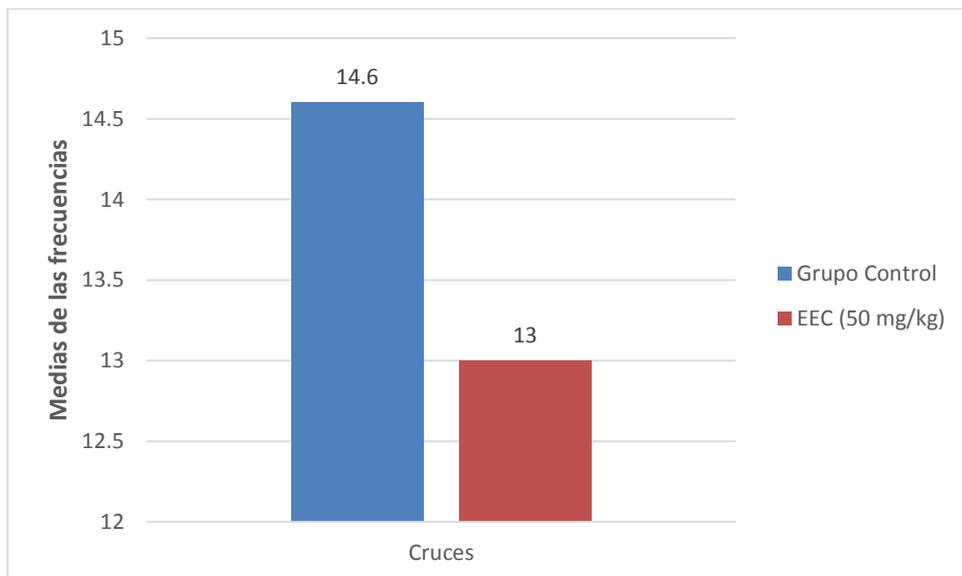


(b)

**Figura 17.** Comparación del efecto de los tratamientos agudos con diferentes dosis del EEC de *A. colubrina* (50; 100; 200 mg/kg) y grupo Control 1 en el FST (a) y el OFT (b). Las barras representan las medias de las frecuencias de cada comportamiento



(a)



(b)

**Figura 18.** Comparación del efecto de los tratamientos crónicos con el EEC de *A. colubrina* (50 mg/kg) y grupo Control 2 en el FST (a) y el OFT (b). Las barras representan las medias de las frecuencias de cada comportamiento

**Tabla 3.** Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencias de los comportamientos en el FST para los tratamientos agudos con el EEC de *Anadenanthera colubrina* (50; 100; 200 mg/kg) vs. Grupo Control 1

Tratamientos Agudos	P		
	Inmovilidad	Nado	Escalamiento
Control 1	-	-	-
50 mg/kg	0.5296	0.6004	0.6004
100 mg/kg	1.0000	0.3443	0.4034
200 mg/kg	0.4020	0.2963	0.8345

**Tabla 4.** Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencias de los comportamientos en el OFT para los tratamientos agudos con el EEC de *Anadenanthera colubrina* (50; 100; 200 mg/kg) vs. Grupo Control 1

Tratamientos Agudos	P
	Número de cruces
Control 1	-
50 mg/kg	0.4564
100 mg/kg	1.0000
200 mg/kg	0.0740

**Tabla 5.** Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el FST para los tratamientos crónicos con el EEC de *Anadenanthera colubrina* (50 mg/kg) vs. Grupo Control 2

Tratamientos Crónicos	P		
	Inmovilidad	Nado	Escalamiento
Control 2	-	-	-
50 mg/kg	0.3443	0.1437	0.2059

**Tabla 6.** Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el OFT para los tratamientos crónicos con el EEC de *Anadenanthera colubrina* (50 mg/kg) vs. Grupo Control 2

Tratamientos Crónicos	p
	Número de cruces
Control 2	-
50 mg/kg	0.2031

**Tabla 7.** Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el FST para los tratamientos agudos (Grupo Control 1) vs. crónicos (Grupo Control 2) con vehículo

Tratamientos	P		
	Inmovilidad	Nado	Escalamiento
Control 1	0.6723	0.1732	0.0937
Control 2	-	-	-

**Tabla 8.** Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el OFT para los tratamientos agudos (Grupo Control 1) vs. crónicos (Grupo Control 2) con vehículo

Tratamientos	P
	Número de cruces
Control 1	0.1388
Control 2	-

**Tabla 9.** Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el FST para los tratamientos agudos (EEC: 50 mg/kg) vs. crónicos (EEC: 50 mg/kg)

Tratamientos	p		
	Inmovilidad	Nado	Escalamiento
EEC - 50 mg/kg (Crónico)	-	-	-
EEC - 50 mg/kg (Agudo)	0.6752	0.0122	0.1161
EEC - 100 mg/kg (Agudo)	0.6723	0.0119	0.0122
EEC - 200 mg/kg (Agudo)	0.5296	0.1437	0.0367

**Tabla 10.** Prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney ( $\alpha=0,05$ ) de las medias de las frecuencia de los comportamiento en el OFT para los tratamientos agudos (EEC: 50 mg/kg) vs. crónicos (EEC: 50 mg/kg)

Tratamientos	P
	Número de cruces
EEC - 50 mg/kg (Crónico)	-
EEC - 50 mg/kg (Agudo)	0.3305
EEC - 100 mg/kg (Agudo)	0.0452
EEC - 200 mg/kg (Agudo)	0.5970

## V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la actividad antidepresiva del extracto etanólico obtenido de la corteza (EEC) de *Anadenanthera colubrina* empleando el test de nado forzado (*forced swimming test*, FST) (Cryan et al, 2005b; Porsolt et al, 1977, 2001), uno de los modelos animales más ampliamente utilizados en la predicción de la actividad antidepresiva (Luo et al, 2008; Stepanichev et al, 2014). Del mismo modo, se buscó determinar si la presencia de actividad en el FST pudo ser debida a un efecto del EEC sobre la actividad psicomotora de los animales de experimentación, por lo cual se utilizó como prueba complementaria el *open field test* (OFT).

La presente discusión ha sido dividida en tres partes:

En la primera parte se discute el potencial de *A. colubrina* como planta antidepresiva. En la segunda parte nos centramos en la metodología empleada en este estudio. Finalmente, en la última parte se discuten los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

### **Parte Uno: *Anadenanthera colubrina* como planta antidepresiva**

*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan es una fabácea que ha sido ampliamente utilizada en la medicina popular en el tratamiento de una diversidad de males (Agra et al, 2007; Albuquerque et al, 2007; Cartaxo et al, 2010; Medeiros et al, 2013). Como se ha indicado anteriormente, los cronistas indicaron que *A. colubrina* era una de las plantas más empleadas en el imperio incaico para el tratamiento de desórdenes mentales como la depresión; no obstante, no existen reportes que evalúen sus posibles efectos antidepresivos. Si bien los cronistas mencionan que los incas hacían uso de las semillas de esta fabácea moliéndolas y mezclándolas con agua o chicha (Elferink, 2000), en el

presente estudio se evalúa la actividad antidepresiva de la corteza de la planta, y no de las semillas.

Ya se ha mencionado la hipótesis propuesta por (Micó et al, 2006) y (Nekovarova et al, 2014) de que el dolor y la depresión comparten las mismas bases neuroquímicas, así como la posible contribución de la neuroinflamación en el desarrollo de la depresión indicada por (Kim et al, 2016) y (Nekovarova et al, 2014), lo que indicaría que los compuestos con actividad analgésica y antiinflamatoria, como las catequinas, esteroides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos, terpenoides y xantonas detectados en la corteza de *A. colubrina* (De Sousa Araújo et al, 2008; Pessoa et al, 2012; Santos et al, 2013; Weber et al, 2011), tendrían actividad antidepresiva. A pesar de esto, a nuestro conocimiento, no existen estudios previos al nuestro que evalúen la actividad antidepresiva del extracto de la corteza de *A. colubrina*.

Si bien no existen reportes previos que estudien la actividad antidepresiva de *A. colubrina*, sí existen trabajos en los que se evalúa su capacidad para tratar otras dolencias o procesos, como los ya mencionados de (Pessoa et al, 2012) y (Santos et al, 2013). En este aspecto, aunque dichos trabajos utilizaron los extractos hidroalcohólicos (Pessoa et al, 2012) o acuosos (Santos et al, 2013) de la corteza de *A. colubrina*, el presente estudio empleó los extractos etanólicos de la corteza dado que este tipo de extractos ha mostrado mayor estabilidad que los extractos acuosos, y no somete los preparados a temperaturas elevadas como sí lo hace la extracción acuosa, previniendo así la degradación de moléculas termolábiles con posible actividad antidepresiva. Es más, la extracción etanólica es capaz de extraer compuestos de una amplia gama de polaridades, y el etanol es menos costoso y tóxico que otros tipos de solventes orgánicos (Carvajal et al.,

2009). En este sentido, los métodos de extracción utilizados en el presente trabajo de investigación representaron modificaciones de los protocolos utilizados por (Kondeti et al, 2010) y (Olaleye et al, 2013) para la obtención de extractos etanólicos a partir de cortezas de otras fabáceas, pues consideramos que estos protocolos se acercaban más a nuestros objetivos.

## **Parte Dos: Metodología**

Antes de la realización del presente trabajo se evaluaron las posibles especies animales y géneros con los cuales realizar el estudio. Si bien la mayor parte de los modelos pueden emplear varios tipos de roedores (*Rattus norvegicus* “rata”, *Mus musculus* “ratón” y *Cavia porcellus* “cuy”), el FST ha sido comúnmente utilizado con ratas y ratones, con ligeras variantes en los protocolos de trabajo. En este aspecto, se decidió utilizar ratas de la raza Holtzman dada la mayor homogeneidad en los resultados obtenidos con esta especie que en los trabajos con ratones (Borsini y Meli, 1988), hecho que lleva incluso a emplear un menor número de ratas (N = 6) que de ratones (N = 10) para obtener datos fiables en este prueba (Porsolt et al, 2001). Debemos indicar que el presente estudio, al ser un trabajo de investigación piloto y dada la disponibilidad de animales de laboratorio, empleó únicamente 5 ratas Holtzman por grupo experimental.

Cada vez más evidencia sugiere que existen diferencias relacionadas con el género en condiciones patológicas como los desórdenes depresivos, con las hembras siendo más propensas a ser afectadas por este tipo de desórdenes que los machos; no obstante esto, la mayor parte de los estudios experimentales evaluando las consecuencias de la exposición al estrés sobre la depresión no tienen en cuenta este hecho y son realizados en roedores machos (Palanza, 2001; Stepanichev et al, 2014). El presente estudio empleó ratas Holtzman de

género femenino toda vez que resulta importante incluir este género en estudios relacionados con la depresión dada la mayor probabilidad de ocurrencia de este desorden en hembras que en machos (2-3:1) (Pawluski et al, 2014; Weissman y Olfson, 1995).

Aunque el uso del extracto etanólico de la corteza (EEC) de *A. colubrina* presentaba la ventaja de poseer más principios activos que los extractos acuosos o hidroalcohólicos de la planta, se nos presentó el problema de hallar un solvente adecuado para nuestro EEC. En este aspecto, en las primeras etapas de los estudios farmacológicos y toxicológicos que implican la evaluación de nuevas moléculas o compuestos con posible actividad farmacológica resulta primordial el uso de excipientes que maximicen la solubilización/suspensión y biodisponibilidad de estos nuevos agentes en estudio, de modo que puedan ser administrados en formulaciones líquidas orales, y evaluados de un modo apropiado (Gopinathan et al, 2013).

Para seleccionar el solvente a utilizar en este estudio, se tomó como referencia un trabajo previo publicado por (Gopinathan et al, 2013), el cual evaluó el efecto provocado por la administración subcrónica oral (5 días) de diversos excipientes comúnmente utilizados en estudios farmacológicos y toxicológicos, empleando diferentes concentraciones de cada uno de ellos; este artículo reportó que ninguno de los excipientes investigados representó mayor riesgo para las unidades experimentales, incluso a concentraciones elevadas. De ese modo, seleccionamos 3 de los excipientes reportados como seguros para iniciar las pruebas de disolución del EEC de *A. colubrina*: (1) etanol (alcohol etílico) de 96°, (2) dimetilsulfóxido (DMSO) y (3) Polisorbato 80 (Tween 80).

El primer ensayo utilizó etanol de 96° a diferentes concentraciones, y aunque éste mostró ser un muy buen disolvente, consultados diferentes

especialistas en el área de fitoquímica de la UPCH, nos recomendaron desistir de su uso pues ha observado toxicidad sobre todo cuando es administrado de forma crónica ([Michel Sauvin, comunicación oral](#)).

El segundo ensayo empleó DMSO, un solvente que cruza la barrera hematoencefálica y disuelve compuestos polares y apolares. Este solvente no mostró ser un buen excipiente para el EEC a las concentraciones de 5% y 10%. Aunque existió la posibilidad de continuar evaluando mayores concentraciones hasta hallar la más apropiada, toda vez que existen estudios en donde se utilizan concentraciones de hasta 20 % ([Piato et al, 2008](#)), desistimos pues se ha reportado que el DMSO no sólo provoca varios efectos secundarios en humanos y en animales (náuseas, vómitos, diarrea, hemólisis, fallo renal o paro cardiorrespiratorio) ([Santos et al, 2003](#)), sino que también produce apoptosis en el SNC de ratones cuando se administra durante varias semanas, efecto también observado con la administración de etanol, incluso durante un corto período de tiempo ([Hanslick et al, 2009](#)).

En el tercer ensayo se usó Tween 80, un surfactante y emulsificante comúnmente empleado en la industria alimentaria. Este excipiente mostró una buena capacidad como solvente del EEC a una concentración de 10% v/v, y dado que, en nuestro conocimiento, no existen estudios que muestren que este aditivo provoque algún tipo de efecto tóxico grave, salvo el realizado por ([Castro et al, 1995](#)), el cual reportó cierta toxicidad a una concentración mayor que la empleada en este trabajo (una disminución en la actividad locomotora en los roedores tratados con Tween 80 al 32% v/v), este excipiente fue seleccionado como solvente para el presente estudio.

Si bien los modelos animales de depresión deberían satisfacer al menos cuatro criterios respecto a la enfermedad humana (similitud de

etiología, bioquímica, sintomatología y tratamiento) (Borsini y Meli, 1988), el trastorno depresivo es un desorden muy “humano” y como tal no es posible replicarlo fielmente en modelos animales (Hendrie et al, 2013). No obstante, el uso de estos modelos nos permite conocer algunas características relevantes para el entendimiento de este desorden. El modelo animal empleado en este trabajo, el FST, resulta atractivo y útil como modelo predictivo de actividad antidepresiva dado que es un test sencillo y rápido de realizar, confiable y sensible a los efectos farmacológicos de los fármacos antidepresivos (Detke et al, 1997).

Aunque en la mayoría de estudios se realiza un FST con tratamientos agudos, nosotros empleamos adicionalmente un tratamiento crónico, administrando durante 18 días una dosis del EEC de *A. colubrina* que no había mostrado efectividad desde el punto de vista estadístico en el tratamiento agudo respecto al grupo Control, toda vez que se trató de evaluar si, al igual que ocurre con ciertos fármacos antidepresivos (Cryan et al, 2005a; Detke et al, 1997; Vásquez-Palacios et al, 2004), la administración p.o. de una dosis no efectiva / subefectiva del EEC en el tratamiento agudo (50 mg/kg) muestra actividad cuando es administrada durante un período de tiempo mayor, tal como se observa en la práctica clínica.

### **Parte Tres: Resultados**

Nuestros resultados fueron procesados utilizando la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon – Mann/Whitney (U de Mann/Whitney,  $\alpha=0,05$ ), y muestran que si bien el tratamiento agudo con tres dosis diferentes del EEC de *Anadenanthera colubrina* (50; 100; 200 mg/kg) produjo en general un descenso en la inmovilidad en el FST (principal indicador para la evaluación de la actividad antidepresiva), este descenso no fue estadísticamente significativo (Tabla 3); del mismo

modo, se pudo observar que el tratamiento crónico con una dosis agudamente subefectiva (50 mg/kg) también implicó una disminución en la inmovilidad respecto al grupo Control, la cual tampoco resultó estadísticamente significativa (Tabla 5). De esta manera, si bien los tratamientos probados mostraron una reducción en la inmovilidad en el cilindro de nado, esta no representó una diferencia significativa respecto al grupo Control. Igualmente, al comparar los diversos tratamientos agudos con el EEC contra el tratamiento crónico con el mismo extracto, tampoco pudo hallarse una diferencia estadísticamente significativa, por lo que no se puede considerar que para nuestro estudio el uso crónico de una dosis subefectiva agudamente ponga de manifiesto su actividad antidepresiva (Tablas 7 y 9), aunque debe precisarse que tal vez el empleo de un mayor número de unidades experimentales o el uso de una dosis mayor del EEC en el tratamiento crónico pudo haber servido para hallar una diferencia más marcada.

De modo similar, el EEC originó variaciones en los comportamientos de nado y escalamiento con respecto a los grupos Control (Tablas 3 y 5), pero de manera distinta a lo observado para el comportamiento de inmovilidad, al comparar los tratamientos agudos versus el tratamiento crónico con el EEC o vehículo en general pudieron observarse diferencias con significancia estadística (Tabla 9). En este aspecto, debe tenerse mucho cuidado al interpretar los resultados obtenidos de los registros de nado y escalamiento, toda vez que estos comportamientos muchas veces son difíciles de distinguir para el observador inexperto (de ahí el uso de software comerciales para realizar el recuento) y el conteo equivocado de las frecuencias puede llevar a error en los procedimientos estadísticos. No obstante esto, es probable que el empleo de un mayor número de unidades experimentales o el uso de una dosis mayor del EEC en el tratamiento crónico pueda servir para hallar diferencias más notorias.

Los resultados obtenidos en el OFT merecen un párrafo aparte, dado que las diferencias observadas fueron mucho más marcadas que las obtenidas para el FST (Tablas 4 y 6). En este sentido, en la comparación de los tratamientos agudos se observó que la dosis más alta del EEC (200 mg/kg) provocó una reducción marcada en la locomoción de los animales de experimentación ( $p=0.0740$ , Tabla 4) con respecto al grupo Control, lo cual sugiere una diferencia que puede ser detectada con pocos individuos. En lo que respecta a la comparación entre los tratamientos agudos y los crónicos, tal como se muestra en la Tabla 10, el tratamiento por 18 días con 50 mg/kg del EEC redujo considerablemente la movilidad de las unidades experimentales en comparación con el tratamiento agudo con 100 mg/kg del EEC ( $p=0.0452$ ).

Con la finalidad de discutir más ampliamente el significado de nuestros resultados, debemos comentar varios puntos:

(1) Si bien no se mostró un efecto estadísticamente significativo del EEC de *Anadenanthera colubrina* sobre el comportamiento de inmovilidad en el FST, se debe indicar que el método empleado para registrar los comportamientos fue el de muestreo (Detke et al, 1995), el cual consiste en registrar los comportamientos predominantes durante la sesión de prueba en intervalos de 5 segundos. En este sentido, es necesario considerar que si bien este método ha sido utilizado en muchos estudios, resulta menos confiable que el registro total de tiempos de cada comportamiento en el test de 5 minutos, el cual ha sido mecanizado mediante el uso de software comerciales más fiables que el registro realizado por un observador.

(2) Por otro lado, deben considerarse los aspectos relacionados con la disolución y dosis de EEC empleados. En este sentido, si bien se seleccionó el Tween 80 como solvente más seguro e inocuo por sobre los

otros excipientes probados, hubo varios problemas de solubilidad durante las pruebas de selección del solvente, problema que debe ser superado para probar dosis más elevadas del EEC de *A. colubrina* y determinar si estos provocan un mayor descenso en la inmovilidad en el FST que las dosis evaluadas en este estudio tanto aguda como crónicamente.

(3) Respecto al procedimiento estadístico seleccionado (prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney), quisiéramos hacer énfasis en la elección de un procedimiento no paramétrico como prueba estadística para este estudio, contraponiendo el empleo de pruebas paramétricas en la mayoría de artículos científicos revisados en los que se emplea el FST o el OFT (Cryan et al, 2005a; Detke et al, 1997; Ribeiro et al, 2006). El motivo de esta decisión se basó en cuatro hechos: (1) el registro de comportamientos, tanto en el FST como en el OFT, se limitó a la contabilización de estos en intervalos de tiempo, es decir a frecuencias, (2) las frecuencias, al no tener una escala de medición apropiada, son consideradas variables cualitativas, (3) el pequeño tamaño de las muestras empleadas ( $N = 5$ ), y (4) que cada análisis estadístico iba a consistir en la comparación de dos muestras independientes de igual tamaño. Estos factores nos llevaron a la conclusión de que el empleo de una prueba no paramétrica, como la prueba de Wilcoxon – Mann/Whitney, era la mejor elección para tratar los datos obtenidos en nuestro estudio, lo cual se sumó al hallazgo de que la hipótesis nula ( $H_0$ ) fue aceptada en la mayoría de los casos (para lo cual los procedimientos no paramétricos son tan buenos como los paramétricos). Adicionalmente, la eficiencia de las pruebas no paramétricas es bastante elevada cuando se trabaja con muestras pequeñas (como en nuestro caso), por lo cual no se vio justificado el empleo de procedimientos paramétricos. Es más, considerando nuestro pequeño tamaño de muestra, se justificaría la elección de un nivel de significancia  $\alpha=0,1$ , pues si bien la mayor parte de

los estudios emplea niveles de significancia entre 0,05 y 0,01, teniendo en cuenta el bajo número de individuos utilizados es muy posible que usando dichos valores de  $\alpha$  la  $H_0$  no sea rechazada a menos que se observe una gran diferencia real (Steel y Torrie, 1988a). A pesar de lo indicado, empleamos un  $\alpha=0,05$  pues los p obtenidos con este nivel de significancia fueron muy similares a los obtenidos con un nivel de significancia  $\alpha=0,1$  (datos no mostrados). Por tal motivo, consideramos conveniente emplear un nivel de significancia  $\alpha=0,05$  para todos los casos (Steel y Torrie, 1988b). No obstante lo argumentado, en la mayoría de referencias citadas se observa el uso de procedimientos paramétricos como el Análisis de Varianza. En este sentido, nos permitimos discrepar del empleo de pruebas paramétricas en este tipo de experimentos, máxime considerando que las observaciones registradas se limitan a la contabilización de las frecuencias de comportamientos tanto en el FST como en el OFT, y el bajo número de individuos utilizados en muchos de esos estudios. Sin dejar de lado lo antes indicado, no negamos que es posible emplear procedimientos paramétricos en trabajos de investigación que evalúen el comportamiento de animales de experimentación, pero consideramos que para esto debe trabajarse con un número suficientemente elevado de individuos (sobre todo cuando se utilizan ratones, los cuales muestran una variabilidad mucho mayor en sus registros que las ratas) y tener en cuenta el registro de variables cuantitativas que puedan ser adecuadamente medidas.

(4) También queremos discutir las diferencias halladas entre los tratamientos con el EEC respecto a los grupos Control (más específicamente, la dosis aguda de 200 mg/kg y la dosis crónica de 50 mg/kg) en el OFT. Si bien el presente estudio estuvo dirigido a evaluar la actividad antidepresiva del EEC, el empleo del OFT como prueba complementaria permite determinar si existe algún efecto del extracto

sobre la actividad locomotora de los animales de experimentación (Freitas et al, 2010; Machado et al, 2007; Prut y Belzung, 2003; Ribeiro et al, 2006). En este sentido, debe indicarse que el OFT no solamente es una prueba de evaluación de la actividad locomotora, sino que también es un test muy empleado en la determinación de los niveles de ansiedad de los individuos evaluados (Crawley, 1985; Kliethermes, 2005; Prut y Belzung, 2003), de modo que el OFT sirve adicionalmente para evaluar la actividad ansiolítica o ansiogénica de un compuesto o extracto. En este aspecto, nuestros resultados sugieren que el EEC muestra un posible efecto ansiolítico en ratas experimentales, no obstante este no fue el objetivo de nuestro estudio, por lo que se requieren investigaciones adicionales para corroborar esta insinuación.

Finalmente, queremos comentar los datos mostrados en el Anexo 10, en donde puede apreciarse que se utilizaron volúmenes diferentes para los tratamientos agudos y para los tratamientos crónicos (4 mL/kg y 2 mL/kg, respectivamente). La toma de esta decisión no fue arbitraria. Para esto, consultamos al Médico Veterinario del LABNEURO y Director del Bioterio del LID de la UPCH, Dr. Christian Roberto Pitot Álvarez, a quien se le comentó que las ratas mostraban signos de ahogo cuando se les administraban los tratamientos en un volumen de 4 mL/kg. Ante esta situación, el Dr. Pitot sugirió reducir el volumen a la mitad siempre y cuando esto no afecte la administración de las dosis evaluadas en los tratamientos crónicos, pues antes que nada debe velarse por el bienestar animal (Christian Pitot, comunicación oral). Por este motivo, decidimos reducir el volumen en los tratamientos crónicos a 2 mL/kg, sin afectar las dosis estudiadas.

## VI. CONCLUSIONES

- 1) El tratamiento agudo con el extracto etanólico de la corteza (EEC) de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan “vilca” o “huayo” en tres dosis (50; 100; 200 mg/kg) provocó en líneas generales un descenso en la inmovilidad en el FST (principal indicador para la evaluación de la actividad antidepresiva) en comparación con el grupo Control; no obstante, esta reducción no fue estadísticamente significativa.
- 2) El tratamiento crónico con el EEC de *A. colubrina* con la dosis empleada (50 mg/kg) provocó una disminución en la inmovilidad en el FST en comparación con el grupo Control; no obstante, este descenso tampoco resultó estadísticamente significativo.
- 3) El tratamiento agudo con el EEC de *A. colubrina* en tres dosis (50; 100; 200 mg/kg) provocó en líneas generales una reducción en la actividad locomotora en el OFT en comparación con el grupo Control, siendo la dosis de 200 mg/kg la que originó la disminución más notoria.
- 4) El tratamiento crónico con el EEC de *A. colubrina* (50 mg/kg) causó una reducción en la actividad locomotora en el OFT en comparación con el grupo Control, aunque esta variación no resultó estadísticamente significativa.

## VII. RECOMENDACIONES

- 1) Elevar el número de individuos en los grupos de estudio con la finalidad de poder hacer inferencias confiables.
- 2) Probar la actividad antidepresiva de dosis más altas del EEC de *A. colubrina*, con la finalidad de ver si existe un efecto más marcado del extracto al elevar las dosis.
- 3) Continuar los estudios empleando agonistas, antagonistas y agentes de receptores específicos de neurotransmisores, con la finalidad de determinar qué moléculas están implicadas en los efectos observados del EEC de *A. colubrina*.
- 4) Realizar un estudio empleando ratas del género masculino, con la finalidad de obtener un estudio pareado y descartar la influencia del factor género en los resultados observados.
- 5) Plantear y ejecutar un estudio que evalúe la actividad ansiolítica y ansiogénica del EEC, pues nuestros resultados han dado indicios de un posible efecto ansiolítico del extracto obtenido de *A. colubrina*.

## VIII. RESUMEN

La depresión es un trastorno psiquiátrico que afecta al 21% de la población mundial. Su tratamiento se basa en el uso de fármacos antidepresivos que no son totalmente efectivos y producen efectos secundarios, por lo que es necesario el desarrollo de antidepresivos más efectivos. Una manera de promover esto es la evaluación de plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de este desorden.

*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan es una fabácea sudamericana utilizada popularmente para tratar muchos males. Considerando (1) la hipótesis de que la depresión y el dolor comparten mecanismos bioquímicos en común, (2) la posible contribución de la neuroinflamación en el desarrollo de la depresión, y (3) la detección de principios activos con propiedades analgésicas y antiinflamatorias en la corteza de *A. colubrina*, evaluamos el efecto del extracto etanólico de la corteza (EEC) en un modelo predictivo de actividad antidepresiva, el test de nado forzado (FST) en ratas (N = 5), complementando esta prueba con un test de evaluación de la actividad locomotora, el *open field test* (OFT); para esto, comparamos el efecto de tratamientos orales agudos (EEC: 50; 100; 200 mg/kg; 1 día) y crónicos (EEC: 50 mg/kg; 18 días) versus grupos Control a los que se les administró vehículo (10% Tween 80 en s.s. 0,9%; 1 o 18 días).

Nuestros resultados mostraron que los tratamientos con el EEC en las dosis evaluadas produjeron una reducción estadísticamente no significativa en la inmovilidad en el FST (principal indicador de actividad antidepresiva) en relación con los grupos Control. En lo que respecta al OFT, los tratamientos provocaron un descenso estadísticamente no significativo en la locomoción en comparación con el Control.

Consideramos que elevando el número de unidades experimentales y las dosis del EEC podría encontrarse una significancia estadística en estudios posteriores.

## IX. REFERENCIAS

- 1) Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJ, Coelho VP. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111: 383-95
- 2) Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida AL, Monteiro JM, Lins Neto EM, Melo JG, Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol.* 2007; 114(3): 325-54
- 3) Bahramsoltani R, Farzaei MH, Farahani MS, Rahimi R. Phytochemical constituents as future antidepressants: a comprehensive review. *Rev Neurosci.* 2015 Jul 4; 1-21. Epub 2015 Abr 19
- 4) Basbaum AI, Jessell TM. La percepción del dolor. En: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principios de Neurociencia.* Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.; 2001. p. 472-91
- 5) Bezerra CW, De Medeiros RM, Rivero BR, Dantas AF, Amaral FR. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos da microrregião de Cariri Cearense. *Ciência Rural.* 2012; 42(6): 1070-6
- 6) Borsini F, Lecci A, Sessarego A, Frassine R, Meli A. Discovery of antidepressant activity by forced swimming test may depend on pre-exposure of rats to a stressful situation. *Psychopharmacology (Berl.).* 1989; 97(2): 183-8

- 7) Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl.)*. 1988; 94(2): 147-60
- 8) Botham PA. Acute systemic toxicity-prospects for tiered testing strategies. *Toxicol In Vitro*. 2004; 18(2): 227-30
- 9) Carvajal L, Hata Y, Sierra N, Rueda D. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Colombia Forestal*. 2009; 12: 161-70
- 10) Cartaxo SL, Souza MM, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2010; 131: 326-42
- 11) Castro CA, Hogan JB, Benson KA, Shehata CW, Landauer MR. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995; 50(4): 521-6
- 12) Christodoulou E, Kadoglou NP, Kostomitsopoulos N, Valsami G. Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications. *J Pharm Pharmacol*. 2015 Aug 14. [Epub ahead of print]
- 13) Crawley JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev*. 1985; 9(1): 37-44
- 14) Cryan JF, Page ME, Lucki I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005; 182(3): 335-44

- 15) Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav R.* 2005; 29: 547-69
- 16) De Lima FO, Alves V, Barbosa Filho JM, Almeida JR, Rodrigues LC, Soares MB, Villarreal CF. Antinociceptive effect of lupeol: evidence for a role of cytokines inhibition. *Phytother Res.* 2013; 27(10): 1557-63
- 17) De Sousa Araújo TA, Alencar NL, de Amorim EL, de Albuquerque UP. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J Ehnopharmacol.* 2008; 120(1): 72-80
- 18) Detke MJ, Johnson J, Lucki I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol.* 1997; 5(2): 107-12
- 19) Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res.* 1996; 73(1-2): 43-6
- 20) Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl).* 1995; 121(1): 66-72
- 21) Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF. Antidepressant and antihemolytic activities of *Vicia sojakii*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014; 18(7): 971-4

- 22) Elferink JG. Desórdenes mentales entre los incas del antiguo Perú. *Revista de Neuro-Psiquiatría*. 2000; 63: 3-18
- 23) Flügge G, van Kampen M, Mijster MJ. Perturbations in brain monoamine systems during stress. *Cell Tissue Res*. 2004; 315: 1-14
- 24) Freitas AE, Budni J, Lobato KR, Binfaré RW, Machado DG, Jacinto J, Veronezi PO, Pizzolatti MG, Rodrigues AL. Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuro-Psychoph*. 2010; 34: 335-43
- 25) Freitas AE, Machado DG, Budni J, Neis VB, Balen GO, Lopes MW, de Souza LF, Veronezi PO, Heller M, Micke GA, Pizzolatti MG, Dafre AL, Leal RB, Rodrigues AL. Antidepressant-like action of the bark ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in the olfactory bulbectomized mice. *J Ethnopharmacol*. 2013; 145: 737-45
- 26) Fu XY, Kang XL, Zhang BT, Jia X. Study on chemical components of *Aconitum flavum* and their inflammatory and analgesic effects. *Zhong Yao Cai*. 2013; 36(5): 747-51
- 27) Fuchs E, Flügge G. Remodelling of Neuronal Networks by Stress. En: Fink G. *Encyclopedia of Stress*. Oxford: Academic Press; 2007. p. 364-70
- 28) Garrido-Suárez BB, Garrido G, Castro-Labrada M, Merino N, Valdés O, Rodeiro I, Hernández I, Godoy-Figueiredo J, Ferreira SH, Delgado-Hernández R. Anti-hypernociceptive effect of mangiferin in persistent and neuropathic pain models in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014; 124: 311-9

- 29) Gold PW. The neurobiology of stress and its relevance to psychotherapy. *Clin Neurosci Res.* 2005; 4: 315-24
- 30) Gopinathan S, O'Neill E, Rodriguez LA, Champ R, Phillips M, Nouraldeen A, Wendt M, Wilson AG, Kramer JA. In vivo toxicology of excipients commonly employed in drug discovery in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2013; 68(2): 284-95
- 31) Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, Farber NB. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis.* 2009; 34(1): 1-10
- 32) Heinrichs SC, Koob GF. Application of Experimental Stressors in Laboratory Rodents. *Curr Protoc Neurosci.* 2006; 34: 8.4.1-8.4.17
- 33) Hendrie C, Pickles A, Stanford SC, Robinson E. The failure of the antidepressant drug discovery process is systemic. *J Psychopharmacol.* 2013; 27(5): 407-13
- 34) Ishola IO, Ochieng CO, Olayemi SO, Jimoh MO, Lawal SM. Potential of novel phytoecdysteroids isolated from *Vitex doniana* in the treatment depression: involvement of monoaminergic systems. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014; 127: 90-100
- 35) Joca SR, Padovan CM, Guimarães FS. Estresse, depressão e hipocampo. *Rev Bras Psiquiatr.* 2003; 25 Supl II: 46-51
- 36) Kandel ER. Trastornos del estado de ánimo: depresión, manía y trastornos de ansiedad. En: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principios de Neurociencia.* Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.; 2001. p. 1209-26

- 37) Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016; 64: 277-84
- 38) Kliethermes CL. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005; 28(8): 837-50
- 39) Kollack-Walker S, Day HE, Akil H. Central Stress Neurocircuits. En: Fink G. *Encyclopedia of Stress*. Oxford: Academic Press; 2007. p. 424-32
- 40) Kondeti VK, Badri KR, Maddirala DR, Thur SK, Fatima SS, Kasetti RB, Rao CA. Effect of *Pterocarpus santalinus* bark, on blood glucose, serum lipids, plasma insulin and hepatic carbohydrate metabolic enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48: 1281-7
- 41) Khursheed R, Rizwani GH, Sultana V, Ahmed M, Kamil A. Antidepressant effect and categorization of inhibitory activity of monoamine oxidase type A and B of ethanolic extract of seeds of *Trigonella foenum graecum* Linn. *Pak J Pharm Sci*. 2014; 27(5 Spec no): 1419-25
- 42) Lee B, Sur B, Kwon S, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. Chronic administration of catechin decreases depression and anxiety-like behaviors in a rat model using chronic corticosterone injections. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013; 21(4): 313-22
- 43) Lipnick RL, Cotruvo JA, Hill RN, Bruce RD, Stitzel KA, Walker AP, Chu I, Goddard M, Segal L, Springer JA, Myers RC. Comparison of the up-and-down, conventional LD<sub>50</sub>, and fixed-

- dose acute toxicity procedures. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33(3): 223-31
- 44) Luo DD, An SC, Zhang X. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. *Brain Res Bull.* 2008; 77: 8-12
- 45) Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(6): 434-45
- 46) Machado DG, Bettio LE, Cunha MP, Santos AR, Pizzolatti MG, Brighente IM, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol.* 2008; 587: 163-8
- 47) Machado DG, Kaster MP, Binfaré RW, Dias M, Santos AR, Pizzolatti MG, Brighente IM, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuro-Psychoph.* 2007; 31: 421-8
- 48) Marcelo-Peña JL, Pennington RT, Reynel C, Zevallos P. Guía ilustrada de la flora leñosa de los bosques estacionalmente secos de Jaén, Perú. 1ra ed. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina / Royal Botanic Garden Edinburgh; 2010
- 49) Marrelli M, Statti G, Conforti F, Menichini F. New Potential Pharmaceutical Applications of *Hypericum* Species. *Mini Rev Med Chem.* 2015 Jul 8. [Epub ahead of print]

- 50) Mathé AA, Husum H, El Khoury A, Jiménez-Vasquez P, Gruber SHM, Wörtwein G, Nikisch G, Baumman P, Ågren H, Andersson W, Södergren Å, Angelucci F. Search for biological correlates of depression and mechanisms of action of antidepressant treatment modalities. Do neuropeptides play a role? *Physiol Behav.* 2007; 92: 226-31
- 51) Medeiros PM, Ladio AH, Albuquerque UP. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. *J Ethnopharmacol.* 2013; 150: 729-46
- 52) Micó JA, Ardid D, Berrocoso E, Eschalier A. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: 348-354
- 53) Mizuki D, Matsumoto K, Tanaka K, Thi Le X, Fujiwara H, Ishikawa T, Higuchi Y. Antidepressant-like effect of *Butea superba* in mice exposed to chronic mild stress and its possible mechanism of action. *J Ethnopharmacol.* 2014; 156: 16-25
- 54) Monteiro JM, de Almeida C de F, de Albuquerque UP, de Lucena RF, Florentino AT, de Oliveira RL. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2006; 2:6
- 55) Montserrat-de la Paz S, Fernández-Arche A, Angel-Martín M, García-Giménez MD. The sterols isolated from Evening Primrose oil modulate the release of proinflammatory mediators. *Phytomedicine.* 2012; 19(12): 1072-6

- 56) Morales-Medina JC, Dumont Y, Quirion R. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Res.* 2010; 1314: 194-205
- 57) Moreira ME, Pereira RG, Dias Silva MJ, Dias DF, Gontijo VS, Giusti-Paiva A, Veloso MP, Doriguetto AC, Nagem TJ, dos Santos MH. Analgesic and anti-inflammatory activities of the 2,8-dihydroxy-1,6-dimethoxyxanthone from *Haploclathra paniculata* (Mart) Benth (Guttiferae). *J Med Food.* 2014; 17(6): 686-93
- 58) Muszyńska B, Łojewski M, Rojowski J, Opoka W, Sułkowska-Ziaja K. Natural products of relevance in the prevention and supportive treatment of depression. *Psychiatr Pol.* 2015; 49(3): 435-53
- 59) National Research Council of the National Academies. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Octava Edición. Washington, DC: The National Academies Press; 2010
- 60) Nekovarova T, Yamamotova A, Vales K, Stuchlik A, Fricova J, Rokyta R. Common mechanisms of pain and depression: are antidepressants also analgesics? *Front Behav Neurosci.* 2014; 8: 99
- 61) Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of Depression. *Neuron.* 2002; 34: 13-25
- 62) Neto SA, Sakamoto SM, Soto-Blanco B. Inquérito epidemiológico sobre plantas tóxicas das mesoregiões Central e Oeste do Rio Grande do Norte. *Ciência Rural.* 2013; 43(7): 1281-7
- 63) Oghenesuvwe EE, Ekene, Nwoke E, Lotanna AD. Guidelines on dosage calculation and stock solution preparation in experimental

animals' studies. Journal of Natural Sciences Research. 2014; 4(18): 100-6

- 64) Olaleye MT, Akinmoladun AC, Crown OO, Ahonsi KE, Adetuyi AO. Homopterocarpin contributes to the restoration of gastric homeostasis by *Pterocarpus erinaceus* following indomethacin intoxication in rats. Asian Pac J Trop Med. 2013; 6(3): 200-4
- 65) Palanza P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? Neurosci Biobehav Rev. 2001; 25(3): 219-33
- 66) Pawluski JL, van Donkelaar E, Abrams Z, Houbart V, Fillet M, Steinbusch HW, Charlier TD. Fluoxetine dose and administration method differentially affect hippocampal plasticity in adult female rats. Neural Plast. 2014; 2014: 123026
- 67) Pessoa WS, Estevão LR, Simões RS, Barros ME, Mendonça F de S, Baratella-Evêncio L, Evêncio-Neto J. Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. Acta Cir Bras. 2012; 27(10): 655-70
- 68) Piato AL, Detanico BC, Jesus JF, Lhullier FL, Nunes DS, Elisabetsky E. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: Further indication of antidepressant properties. J Ethnopharmacol. 2008; 118(2):300-4
- 69) Porsolt RD, Brossard G, Hautbois C, Roux S. Rodent Models of Depression: Forced Swimming and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice. En: Current Protocols in Neuroscience. John Wiley & Sons, Inc. 2001; 14: 8.10A.1-10

- 70) Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977; 266: 730-2
- 71) Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003; 463(1-3): 3-33
- 72) Quiñonez-Bastidas GN, Cervantes-Durán C, Rocha-González HI, Murbartían J, Granados-Soto V. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of epicatechin in diabetic rats. *Life Sci*. 2013; 93(17): 637-45
- 73) Ribeiro MD, Onusic GM, Poltronieri SC, Viana MB. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39 (2): 263-70
- 74) Said A, Abuotabl EA, Raof GF, Huefner A, Nada SA. Phenolic contents and bioactivities of pericarp and seeds of *Pleiogynium solandri* (Benth.) Engl. (Anacardiaceae). *Iran J Basic Med Sci*. 2015; 18(2): 164-71
- 75) Saki K, Bahmani M, Rafieian-Kopaei M. The effect of most important medicinal plants on two important psychiatric disorders (anxiety and depression)-a review. *Asian Pac J Trop Med*. 2014; 7S1: S34-42
- 76) Santos JS, Marinho RR, Ekundi-Valentim E, Rodrigues L, Yamamoto MH, Teixeira SA, Muscara MN, Costa SK, Thomazzi SM. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. *J Ethnopharmacol*. 2013; 148: 218-22

- 77) Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65(7): 1035-41
- 78) Selye H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature.* 1936; 138: 32
- 79) Snell RS. Fibras nerviosas y nervios periféricos. En: Snell RS. *Neuroanatomía Clínica.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.; 1999. p. 93-125
- 80) Snell RS. Tractos ascendentes de la médula espinal y el encéfalo. En: Snell RS. *Neuroanatomía Clínica.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.; 1999. p. 367-85
- 81) Steel RG, Torrie JH. Comparaciones entre dos medias muestrales. En: Steel RG, Torrie JH. *Bioestadística: Principios y Procedimientos.* México, D.F.: McGraw-Hill/Interamericana de México, S.A. de C.V.; 1988. p. 87-8
- 82) Steel RG, Torrie JH. Estadística no paramétrica. En: Steel RG, Torrie JH. *Bioestadística: Principios y Procedimientos.* México, D.F.: McGraw-Hill/Interamericana de México, S.A. de C.V.; 1988. p. 520-1, 528-9
- 83) Stepanichev M, Dygalo NN, Grigoryan G, Shishkina GT, Gulyaeva N. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 932757
- 84) Suresh S, Prithviraj E, Prakash S. Dose- and time-dependent effects of ethanolic extract of *Mucuna pruriens* Linn. seed on sexual

- behaviour of normal male rats. *J Ethnopharmacol.* 2009; 122: 497-501
- 85) Thao NP, Luyen BT, Koo JE, Kim S, Koh YS, Thanh NV, Cuong NX, Kiem PV, Minh CV, Kim YH. In vitro anti-inflammatory components isolated from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis* (Lour.) Rafarin. *Pharm Biol.* 2015 Jul 17; 1-7 [Epub ahead of print]
- 86) Vásquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H, Velásquez-Moctezuma J. Antidepressant-like effects of the acute and chronic administration of nicotine in the rat forced swimming test and its interaction with fluoxetine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; 78(1): 165-9
- 87) Weber CR, Soares CM, Lopes AB, Silva TS, Nascimento MS, Ximenes EC. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. *Rev Bras Farm.* 2011; 92(4):235-44
- 88) Weissman MM, Olfson M. Depression in women: implications for health care research. *Science.* 1995; 269(5225): 799-801
- 89) Wong GT, Chang RC, Law AC. A breach in the scaffold: the possible role of cytoskeleton dysfunction in the pathogenesis of major depression. *Ageing Res Rev.* 2013; 12(1): 67-75
- 90) Xu Y, Li S, Chen R, Li G, Barish PA, You W, Chen L, Lin M, Ku B, Pan J, Ogle WO. Antidepressant-like effect of low molecular proanthocyanidin in mice: involvement of monoaminergic system. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010; 94(3): 447-53
- 91) Zhao X, Chen Q, Liu Y, Xia C, Shi J, Zheng M. Effect of xanthone derivatives on animal models of depression. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2014; 76: 45-50

# **ANEXOS**

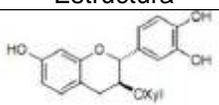
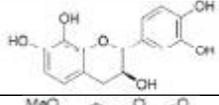
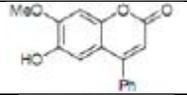
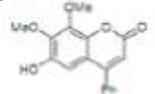
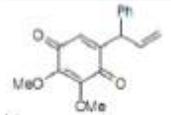
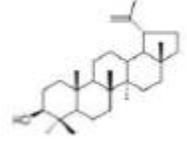
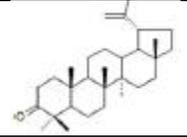
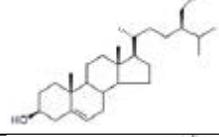
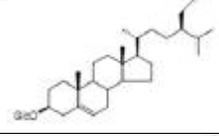
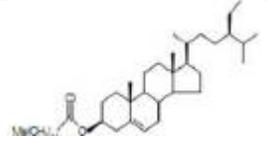
## ANEXO 1

### Clasificación taxonómica de *Anadenanthera colubrina*

<b>Superreino</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Fabales</i>
<b>Familia</b>	<i>Fabaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Mimosoideae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Mimoseae</i>
<b>Género</b>	<i>Anadenanthera</i>
<b>Especie</b>	<i>A. colubrina</i> (Vell.) Brenan

## ANEXO 2

### Estructura de algunos metabolitos aislados de la corteza de *Anadenanthera colubrina* (Weber et al, 2011)

Metabolito	Estructura	Tipo
Anadantosídeo		Flavonoide
Prosopina		Flavonoide
Dalbergina		Otras sustancias aromáticas
Kuhimannina		Otras sustancias aromáticas
Dimetoxidalbergina		Otras sustancias aromáticas
Lupeol		Terpenoide
Lupeona		Terpenoide
$\beta$ -sitosterol		Esterol
Daucosterol		Esterol
Palmitato de $\beta$ -sitosterol		Esterol

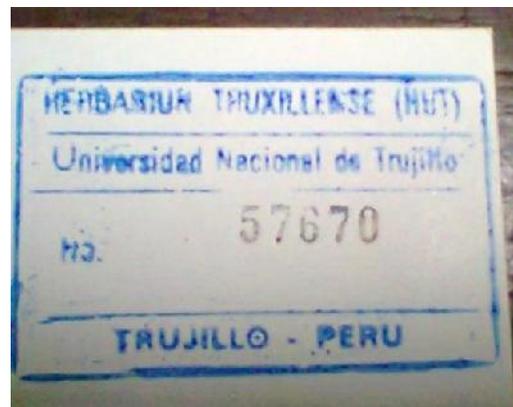
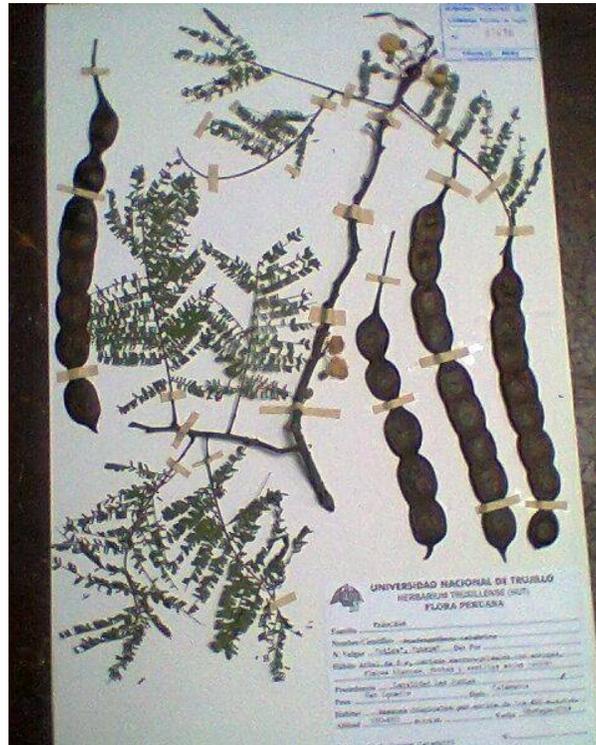
### ANEXO 3

#### Bosque primario del Centro poblado Las Juntas, Provincia de San Ignacio, Departamento de Cajamarca



## ANEXO 4

Muestras conservadas de ramas, flores y frutos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan “vilca” o “huayo” del Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT)



## ANEXO 5

### Ambiente del bioterio del Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento (LABNEURO) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH)



## ANEXO 6

Registro del peso, dosis y volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* previo a la prueba de toxicidad aguda

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Dosis asignada (mg/kg)</b>	<b>Dosis correspondiente (mg)</b>
Rata 1	212	200	42,4
Rata 2	198	50	9,9
Rata 3	192	200	38,4
Rata 4	214	100	21,4
Rata 5	200	100	20

## ANEXO 7

Tratamientos agudos – Pesaje de las unidades experimentales de cada grupo para la determinación del volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* o vehículo (10% de Tween 80 en s.s. 0,9%) a ser administrados de acuerdo a la dosis correspondiente

### (A) EEC (50 mg/kg)

Unidad experimental	Peso (g)	mg EEC	mL EEC	mL TOTAL	Hora p.o.	Hora FST	Hora OFT
Rata 1	214	10,7	0,214	0,856	10:07	11:17	15:17
Rata 2	196	9,8	0,196	0,784	10:35	12:47	16:10
Rata 3	210	10,5	0,210	0,840	10:21	11:32	15:30
Rata 4	216	10,8	0,216	0,864	10:26	11:55	15:40
Rata 5	200	10,0	0,200	0,800	10:31	12:11	15:52

### (B) EEC (100 mg/kg)

Unidad experimental	Peso (g)	mg EEC	mL EEC	mL TOTAL	Hora p.o.	Hora FST	Hora OFT
Rata 1	218	21,8	0,436	0,872	10:16	11:26	15:26
Rata 2	216	21,6	0,432	0,864	10:23	11:35	15:34
Rata 3	198	19,8	0,396	0,792	10:29	12:06	15:46
Rata 4	218	21,8	0,436	0,872	10:36	12:19	15:52
Rata 5	212	21,2	0,424	0,848	10:43	12:40	16:06

...continuación

**(C) EEC (200 mg/kg)**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>	<b>Hora p.o.</b>	<b>Hora FST</b>	<b>Hora OFT</b>
Rata 1	195	39,0	0,780	0,780	10:34	11:46	15:40
Rata 2	194	38,8	0,776	0,776	10:40	12:00	15:45
Rata 3	204	40,8	0,816	0,816	10:46	12:43	15:50
Rata 4	226	45,2	0,904	0,904	10:55	12:55	15:55
Rata 5	204	40,8	0,816	0,816	11:04	13:23	16:00

**(D) Grupo Control (vehículo)**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>	<b>Hora p.o.</b>	<b>Hora FST</b>	<b>Hora OFT</b>
Rata 1	208	0,832	10:02	11:17	15:13
Rata 2	200	0,800	10:08	11:31	15:23
Rata 3	190	0,760	10:11	12:10	15:35
Rata 4	198	0,792	10:20	12:27	15:45
Rata 5	204	0,816	10:25	13:08	15:55

## ANEXO 8

Tratamientos crónicos – Pesaje de las unidades experimentales de cada grupo para la determinación del volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* o vehículo (10% de Tween 80 en s.s. 0,9%) a ser administrados de acuerdo a la dosis correspondiente en los días 1 a 17 de tratamiento crónico

### (A) EEC (50 mg/kg)

#### Día 1

Unidad experimental	Peso (g)	mg EEC	mL EEC	mL TOTAL
Rata 1	242	12,1	0,242	0,484
Rata 2	238	11,9	0,238	0,476
Rata 3	232	11,6	0,232	0,464
Rata 4	238	11,9	0,238	0,476
Rata 5	214	10,7	0,214	0,428

#### Día 2

Unidad experimental	Peso (g)	mg EEC	mL EEC	mL TOTAL
Rata 1	242	12,1	0,242	0,484
Rata 2	244	12,2	0,244	0,488
Rata 3	236	11,8	0,236	0,472
Rata 4	238	11,9	0,238	0,476
Rata 5	220	11,0	0,220	0,440

...continuación

**Día 3**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	242	12,1	0,242	0,484
Rata 2	244	12,2	0,244	0,488
Rata 3	236	11,8	0,236	0,472
Rata 4	238	11,9	0,238	0,476
Rata 5	216	10,8	0,216	0,432

**Día 4**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	236	11,8	0,236	0,472
Rata 2	240	12,0	0,240	0,480
Rata 3	228	11,4	0,228	0,456
Rata 4	236	11,8	0,236	0,472
Rata 5	212	10,6	0,212	0,424

**Día 5**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	236	11,8	0,236	0,472
Rata 2	240	12,0	0,240	0,480
Rata 3	230	11,5	0,230	0,460
Rata 4	234	11,7	0,234	0,468
Rata 5	214	10,7	0,214	0,428

...continuación

**Día 6**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	238	11,9	0,238	0,476
Rata 2	240	12,0	0,240	0,480
Rata 3	234	11,7	0,234	0,468
Rata 4	232	11,6	0,232	0,464
Rata 5	218	10,9	0,218	0,436

**Día 7**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	238	11,9	0,238	0,476
Rata 2	240	12,0	0,240	0,480
Rata 3	236	11,8	0,236	0,472
Rata 4	236	11,8	0,236	0,472
Rata 5	218	10,9	0,218	0,436

**Día 8**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	232	11,6	0,232	0,464
Rata 2	236	11,8	0,236	0,472
Rata 3	230	11,5	0,230	0,460
Rata 4	228	11,4	0,228	0,456
Rata 5	208	10,4	0,208	0,416

...continuación

**Día 9**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	232	11,6	0,232	0,464
Rata 2	238	11,9	0,238	0,476
Rata 3	236	11,8	0,236	0,472
Rata 4	230	11,5	0,230	0,460
Rata 5	210	10,5	0,210	0,420

**Día 10**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	238	11,9	0,238	0,476
Rata 2	242	12,1	0,242	0,484
Rata 3	236	11,8	0,236	0,472
Rata 4	238	11,9	0,238	0,476
Rata 5	218	10,9	0,218	0,436

**Día 11**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	234	11,7	0,234	0,468
Rata 2	234	11,7	0,234	0,468
Rata 3	230	11,5	0,230	0,460
Rata 4	230	11,5	0,230	0,460
Rata 5	210	10,5	0,210	0,420

...continuación

**Día 12**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	240	12,0	0,240	0,480
Rata 2	240	12,0	0,240	0,480
Rata 3	238	11,9	0,238	0,476
Rata 4	236	11,8	0,236	0,472
Rata 5	216	10,8	0,216	0,432

**Día 13**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	238	11,9	0,238	0,476
Rata 2	238	11,9	0,238	0,476
Rata 3	236	11,8	0,236	0,472
Rata 4	238	11,9	0,238	0,476
Rata 5	214	10,7	0,214	0,428

**Día 14**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	242	12,1	0,242	0,484
Rata 2	240	12,0	0,240	0,480
Rata 3	236	11,8	0,236	0,472
Rata 4	242	12,1	0,242	0,484
Rata 5	218	10,9	0,218	0,436

...continuación

### Día 15

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	238	11,9	0,238	0,476
Rata 2	240	12,0	0,240	0,480
Rata 3	234	11,7	0,234	0,468
Rata 4	236	11,8	0,236	0,472
Rata 5	212	10,6	0,212	0,424

### Día 16

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	238	11,9	0,238	0,476
Rata 2	240	12,0	0,240	0,480
Rata 3	236	11,8	0,236	0,472
Rata 4	236	11,8	0,236	0,472
Rata 5	216	10,8	0,216	0,432

### Día 17

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>
Rata 1	242	12,1	0,242	0,484
Rata 2	240	12,0	0,240	0,480
Rata 3	236	11,8	0,236	0,472
Rata 4	238	11,9	0,238	0,476
Rata 5	212	10,6	0,212	0,424

...continuación

**(B) Grupo Control (Vehículo)**

**Día 1**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	228	0,456
2	228	0,456
3	226	0,452
4	228	0,456
5	204	0,408

**Día 2**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	224	0,448
2	228	0,456
3	222	0,444
4	230	0,460
5	206	0,412

**Día 3**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	232	0,464
2	230	0,460
3	224	0,448
4	230	0,460
5	204	0,408

...continuación

**Día 4**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	234	0,468
2	224	0,448
3	230	0,460
4	232	0,464
5	204	0,408

**Día 5**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	228	0,456
2	224	0,448
3	226	0,452
4	228	0,456
5	202	0,404

**Día 6**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	234	0,468
2	228	0,456
3	224	0,448
4	234	0,468
5	206	0,412

...continuación

**Día 7**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	234	0,468
2	230	0,460
3	226	0,452
4	232	0,464
5	206	0,412

**Día 8**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	228	0,456
2	220	0,440
3	222	0,444
4	228	0,456
5	202	0,404

**Día 9**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	234	0,468
2	226	0,452
3	234	0,468
4	236	0,472
5	210	0,420

...continuación

**Día 10**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	230	0,460
2	228	0,456
3	230	0,460
4	236	0,472
5	210	0,420

**Día 11**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	230	0,460
2	230	0,460
3	230	0,460
4	232	0,464
5	208	0,416

**Día 12**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	236	0,472
2	238	0,476
3	236	0,472
4	238	0,476
5	210	0,420

...continuación

**Día 13**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	230	0,460
2	232	0,464
3	230	0,460
4	232	0,464
5	208	0,416

**Día 14**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	236	0,472
2	232	0,464
3	232	0,464
4	238	0,476
5	210	0,420

**Día 15**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	236	0,472
2	234	0,468
3	234	0,468
4	236	0,472
5	210	0,420

...continuación

**Día 16**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	232	0,464
2	234	0,468
3	232	0,464
4	238	0,476
5	210	0,420

**Día 17**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>
1	234	0,468
2	238	0,476
3	238	0,476
4	240	0,480
5	208	0,416

## ANEXO 9

**Tratamientos crónicos – Pesaje de las unidades experimentales de cada grupo para la determinación del volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* o vehículo (10% de Tween 80 en s.s. 0,9%) a ser administrados de acuerdo a la dosis correspondiente en el último día de tratamiento crónico (día 18)**

### **(A) EEC (50 mg/kg)**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mg EEC</b>	<b>mL EEC</b>	<b>mL TOTAL</b>	<b>Hora p.o.</b>	<b>Hora FST</b>	<b>Hora OFT</b>
Rata 1	242	12,1	0,242	0,484	10:49	12:33	16:33
Rata 2	236	11,8	0,236	0,472	10:51	12:45	16:41
Rata 3	240	12,0	0,240	0,480	10:53	13:12	16:49
Rata 4	240	12,0	0,240	0,480	10:56	13:24	16:59
Rata 5	214	10,7	0,214	0,428	11:02	13:58	17:10

### **(B) Grupo Control (vehículo)**

<b>Unidad experimental</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>mL</b>	<b>Hora p.o.</b>	<b>Hora FST</b>	<b>Hora OFT</b>
Rata 1	242	0,484	10:49	12:33	16:33
Rata 2	242	0,484	10:51	12:45	16:41
Rata 3	244	0,488	10:53	13:15	16:55
Rata 4	244	0,488	10:56	13:26	16:58
Rata 5	216	0,432	11:01	13:58	17:05

## ANEXO 10

**Cálculo de la concentración y volumen del EEC de *Anadenanthera colubrina* y vehículo a ser administrados a las unidades experimentales en base a las dosis determinadas (Oghenesuvwe et al, 2014)**

**Cálculo de la Dosis:  $x = \frac{\text{Peso corporal del animal (g)}}{1000 \text{ g}} \times \text{Dosis (mg)}$**

**Determinación del volumen de EEC de *A. colubrina* a administrar:**

- (1) **Concentración del EEC de *A. colubrina* (1000 mg EEC/20 mL solución)  
→ Volumen del EEC a administrar (en mL) = (0,02) (x)**

**Determinación del volumen de solución total a administrar:**

- (2) **Para tratamientos agudos: 4 mL/kg → Cálculo del volumen (en mL)\* = 0,004 x Peso corporal del animal (g);**
- (3) **Para tratamientos crónicos: 2 mL/kg → Cálculo del volumen (en mL)\* = 0,002 x Peso corporal del animal (g);**

**donde x = EEC (mg)**

**\*Cálculo del volumen total a administrarse de EEC (Grupo 200 mg/kg) y vehículo (Grupos Control). Para los grupos de EEC (50 mg/kg, Agudo y Crónico) y EEC (100 mg/kg) primero se calcula el volumen de EEC a administrarse y luego se completa con vehículo hasta el volumen total en base al peso del animal**