



ORIGINAL

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANSIOLÍTICO DE LA INFUSIÓN DE *MENTHA PIPERITA* EN RATONES MEDIANTE LA PRUEBA DEL LABERINTO ELEVADO EN CRUZ

María Emilia López Rumich, María Giannina Meza Fleitas, Isabel María Jesús Morán Britos, Adriana Magalí Núñez Orrego, Claudia Centurión-Wenninger

Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

Introducción: La infusión de las hojas de *Mentha piperita* (toronjil de menta) se emplea para el tratamiento del insomnio, parestesias, vértigo y enfermedades neurológicas. El objetivo de esta investigación es evaluar los efectos ansiolíticos de *M. piperita* con la prueba del laberinto cruzado en ratones albinos suizos adultos, de marzo a junio de 2015.

Métodos: Se utilizó la prueba de laberinto en cruz elevado con 16 ratones albinos suizos (*Mus musculus*) adultos; divididos en cuatro grupos: a dos se les administró la infusión de menta en concentraciones diferentes, al grupo control se le administró clonazepam y al grupo placebo, agua. Con 5 días de aclimatación, por 7 días se les administró la medicación y en el día 13 se realizó la prueba conductual. Se midió el número de entradas y su tiempo de permanencia en los brazos abiertos (EBA, BA respectivamente), para poder apreciar el estado ansiolítico. Se tomó $p < 0,05$ para la comparación de grupos.

Resultados: El número total de entradas a los BA en el grupo droga: $75 \pm 5,90$, grupo control: $20,33 \pm 6,11$ y grupo infusión de *M. piperita*: $17,5 \pm 6,34$. El grupo de infusión de *M. piperita* comparado con el grupo control ($p = 0,0199$) y el grupo clonazepam ($p = 0,0238$) hubo diferencias en el porcentaje de número de EBA y el tiempo de permanencia en los BA.

Conclusiones: Se demostró que la administración de la infusión aumentó en una pequeña proporción el número de EBA y el tiempo de permanencia en BA del laberinto. Se requieren más estudios con el fin de continuar con su análisis fitoquímico y determinar su perfil de seguridad.

Palabras clave: Ansiolíticos, *Mentha piperita*, Clonazepam

DETERMINATION OF THE ANXIOLYTIC EFFECT OF *MENTHA PIPERITA* INFUSION IN MICE USING THE ELEVATED PLUS MAZE ABSTRACT

Background: The infusion made of *Mentha piperita* leaves' is used for the treatment of insomnia, paresthesia, vertigo and neurological diseases. The objective of this study is to evaluate the anxiolytic effect of *M. piperita* with the elevated plus maze test in swiss albino mice, from March to June 2015.

Methods: The elevated maze test was used with 16 Swiss albino mice (*Mus musculus*). We divided them into four groups: two received peppermint tea in different concentrations, the control group received clonazepam and a placebo group received water. After five days of acclimatization, they received medication for 7 days, and on the 13th day they were submitted to the behavioral test: the elevated maze test. The number of entries and the time of staying on the open arms (EOA and OA, respectively) were measured to appreciate the anxiolytic status of these animals. $p < 0.05$ was considered for comparison between the groups.

Results: Number of total EOA in the clonazepam group: 75 ± 5.90 , control group: 20.33 ± 6.11 and *M. piperita* group: 17.5 ± 6.34 . *M. piperita* group compared to control group ($p = 0.0199$) and clonazepam ($p = 0.0238$) there were differences between the percentage of the number in EOA and the time of stay in the OA.

Conclusion: It was demonstrated that the administration of *M. piperita* increased in a small proportion the number of EOA, and the time of stay in OA of the maze. More studies of phytochemical analysis of this plant is required and to determine its safety profile.

Keywords: Anti-Anxiety Agents; *Mentha Piperita*; Clonazepam.

INTRODUCCIÓN:

La ansiedad es uno de los trastornos mentales más comunes en la actualidad, se produce por la activación del sistema nervioso ante reacciones involuntarias. Estas reacciones se manifiestan generando incomodidad, inquietud, inseguridad e influyen negativamente en la vida de la persona (1).

Estudios previos han demostrado que la ansiedad es un factor muy influyente

en el curso y fin de una patología. La cronificación de la ansiedad generaría una inmunosupresión con riesgo aumentado de contraer enfermedades (2).

La *Mentha piperita* es una planta proveniente de Europa con fuerte olor a mentol, con hojas de color verde oscuro de forma ovalada y tallos violáceos ramificados. Para los fines medicinales se

utilizan las hojas más tiernas y las flores. Tiene una amplia variedad de efectos sobre el organismo: estimulante, antiviral, antifúngico, relajante muscular, entre otros (3); pero el de mayor interés para este estudio es el efecto tranquilizante sobre el sistema nervioso central, por lo que es utilizada para combatir la ansiedad.

El estudio del comportamiento de una rata de laboratorio en el laberinto en cruz elevado (LCE) es empleado en la comprensión de algunos estados anímicos y en pruebas de medicamentos ansiolíticos y ansiogénicos. Algunos autores sugieren que el modelo computacional de una rata de laboratorio en LCE permitiría un mejor entendimiento del funcionamiento del cerebro ante ciertos medicamentos y en ciertos estados anímicos (4).

Con este estudio se busca comprobar si existe relación entre la disminución del estado ansioso y la administración de la infusión acuosa de la *M. piperita*, debido a que en Paraguay es muy utilizada en bebidas como el té, el mate y el tereré. El objetivo de esta investigación es evaluar los efectos ansiolíticos de *M. piperita* con la prueba del laberinto cruzado en ratones albinos suizos adultos, de marzo a junio de 2015

MATERIALES Y MÉTODOS:

Diseño: Experimental, comparativo. La hipótesis alterna fue: “La infusión acuosa de hojas de menta produce efectos ansiolíticos en ratones albinos suizos machos, demostrables con la prueba del laberinto en cruz elevado”. La hipótesis nula fue: “La infusión acuosa de hojas de menta no produce efectos ansiolíticos en ratones albinos suizos machos, demostrables con la prueba del laberinto en cruz elevado”.

Delimitación del trabajo: Realizado en el laboratorio y bioterio de la cátedra de

Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay.

Marco temporal: De marzo hasta agosto de 2015.

Población: Se utilizaron para el estudio a 16 ratones albinos suizos (*Mus musculus*) adultos machos, con un peso medio de 29 gramos. Los mismos procedían del laboratorio de farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo - Paraguay. Fueron separados al azar en 4 grupos de 4 individuos cada uno, estos fueron sometidos a un periodo de adaptación de 5 días, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y a una temperatura entre 19° a 23°C, con acceso a agua y a alimentación. Los siete días posteriores a la aclimatación se les administraron las drogas y el placebo por la sonda orogástrica en el mismo horario, a partir del mediodía hasta las 13 horas aproximadamente.

Muestreo: Probabilístico aleatorio simple.

Criterios de inclusión: Ratones albinos suizos machos, con peso promedio de 29 gramos, sin patologías de base.

Criterios de exclusión: Ratones albinos suizos hembras, con patologías de base.

Variables

Dependientes: tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, tiempo de permanencia en los brazos cerrados del laberinto en cruz elevado, tiempo de permanencia en el centro del laberinto en cruz elevado.

Independientes: administración de la infusión de *M. piperita*.

Descripción del procedimiento:

Se dividieron los ratones en 4 grupos:

Tabla 1. Parámetros espacio temporales en la medida del efecto ansiolítico de la *Mentha piperita* en ratones *Mus musculus*.

Parámetros espaciotemporales	Total
Número de entradas en los BA*	86
Número de entradas en los BC**	194
Tiempo de permanencia en los BA*	645,14%
Tiempo de permanencia en los BC**	2682,73%
Tiempo de permanencia en el centro	1177,02%
Número total de entrada en los brazos	280

*BA: Brazos abiertos. **BC: Brazos cerrados

- **Grupo Experimental 1:** administración de una dosis de 1000 mg/kg de infusión acuosa de *M. piperita*. La dosis fue seleccionada por ser utilizada en trabajos previos, sin llegar a ser tóxica para los animales (4,5).
- **Grupo Control Droga:** administración de clonazepam (0,5 mg/kg), con la finalidad de utilizarlo como grupo de comparación al ser esta droga un ansiolítico de reconocidos efectos (6).
- **Grupo Experimental 2:** administración de una dosis de 750 mg/Kg de infusión acuosa de *M. piperita* para descartar un posible efecto ansiolítico como sesgo en el estudio (5).
- **Grupo Control Técnica:** control sin drogas, sin exposición a ningún fármaco estudiado, pero que se encuentran en el mismo ambiente y con las mismas manipulaciones que los demás grupos durante el mismo tiempo en que se desarrollara la prueba, cuyas medidas sirvieron para ser comparadas con las de los demás.

Instrumento de medición y técnica:

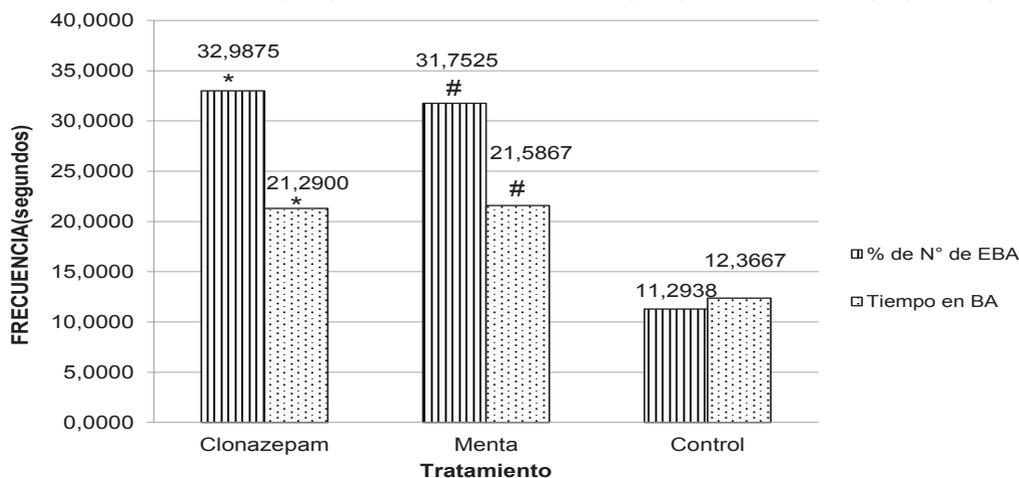
Como características estándar, el laberinto elevado consta de 4 brazos o calles situados perpendicularmente, cuya intersección

da lugar a un pequeño recuadrado central (5x5 cm). Dos de los brazos se encuentran “cerrados” por unas paredes situadas a los lados, mientras que los brazos “abiertos” están desprotegidos. Las paredes de los brazos cerrados con una altura de 15 cm y construidas de plástico transparente.

Los cuatro brazos tienen las mismas dimensiones: 30x5 cm; en ellos un bordillo de 0,25 cm, situándose la elevación a 60 cm del suelo (7). La iluminación que recibe el aparato es a través de una bombilla de 60 W de color rojo. La duración cada sesión es de 5 min. En su inicio, se coloca al animal en el centro del laberinto, suspendido por la cola, de cara a uno de los dos brazos abiertos, al tiempo que da comienzo la videograbación (8).

La consideración de todos estos índices permite observar el posible efecto ansiogénico o ansiolítico que ejerce el fármaco administrado en relación con las características intrínsecas del modelo. Los efectos ansiolíticos vendrían indicados por un incremento de la frecuencia de entradas en los brazos abiertos y en el tiempo que pasan los animales en estos (7).

Figura 1. Efecto de la infusión acuosa de *Mentha piperita* (Dosis: 750mg/Kg) y clonazepam (Dosis: 0,5mg/Kg) en el promedio de la frecuencia de entrada y tiempo de permanencia en las zonas abiertas del Laberinto en Cruz Elevado(LCE), Entrada a Brazos Abiertos (EBA), Brazos abiertos (BA). 2015 (n=15).



* $p < 0,05$ comparado con el grupo control, $p = 0,0199$
 # $p < 0,05$ comparado con el grupo clonazepam, $p = 0,0238$
 EBA: entrada a brazos abiertos. BA: brazos abiertos

Para la elaboración de la infusión se recogieron plantas de *M. piperita* de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, luego se dejaron secar y se molieron con un mortero. La manera de prepararla adecuadamente es añadir dos cucharadas de las hojas molidas en 100ml de agua, hervir y dejar reposar con fin de llegar al 10% de infusión acuosa en 100ml de agua (6).

Se grabó la sesión para posteriormente registrar los parámetros conductuales que son la frecuencia del número de entradas a los brazos abiertos y cerrados, así como la cantidad del tiempo de permanencia en estos y en el cuadro central para cada uno de los sujetos. El criterio en ambos casos era que los sujetos tuvieran las 4 patas en el brazo del laberinto; la duración de la sesión fue de cinco minutos. Estos datos se usaron para calcular el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) de acuerdo con la siguiente fórmula: $[(\text{No. entradas a brazos abiertos} / (\text{No. abiertos} + \text{cerrados})) \times 100]$ y el porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos (TBA): $[(\text{tiempo en brazo abierto} / 300) \times 100]$, así como el total

de entradas (entradas en brazos abierto + entradas en brazos cerrados). Las pruebas fueron grabadas por la cámara de video y posteriormente fueron analizadas (9).

Se utilizó el ansiolítico clonazepam por resultados óptimos comprobados en estudios similares a este, donde se vio que estas plantas con efectos ansiolíticos tendrían resultados óptimos comparables con esta droga (10).

Materiales y recursos

Condiciones de alojamiento: Los ratones fueron alojados en cajas de plástico (longitud: 25 cm, ancho: 10 cm, altura: 15 cm) hasta el momento de las pruebas, 4 ratones machos por caja. Las cajas fueron confeccionadas según las normas del bioterio de la cátedra de Fisiopatología. Se utilizaron virutas de madera previamente esterilizadas para cubrir el fondo de las cajas. Recibieron comida (Supermix®, Industria Paraguaya) y el agua tratada según indicaciones de la cátedra (en 2 litros de agua, 2 gotas de lavandina marca Base Base®, Industria Paraguaya) ad libitum. La viruta necesaria para las jaulas de los animales fue adquirida de una carpintería y se esterilizó en la estufa

del bioterio de la cátedra de Microbiología según los protocolos estandarizados para dicho procedimiento.

Instrumento de trabajo:

Filmaciones grabadas con una cámara SONY DSC-H50 (SONY Europe, distribuido desde España) convertidas al formato AVI 320x240 en escala de grises que permitió analizarlas con el programa Ethowatcher®.

Control de calidad: El control de la calidad de la prueba se realizó con un grupo control sin exposición a ningún fármaco estudiado, pero que se encontró en el mismo ambiente y fue sometido a las mismas técnicas de administración de sustancias por sonda orogástrica, pero con placebo durante el mismo tiempo en que se desarrolló la prueba, cuyas medidas sirvieron para el análisis comparativo con los demás grupos.

Asuntos éticos: Se siguieron las normas de ética animal según consta en el manual del bioterio de la cátedra de Fisiopatología donde se realizó el experimento; tratando de minimizar en todo momento el sufrimiento del animal. De igual manera, todos los animales de estudio fueron sometidos a eutanasia con inyección de tiopental una vez finalizadas las pruebas.

Análisis estadísticos: Los datos fueron procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para el análisis descriptivo de variables, los cuales se presentaron en gráficos y tablas de frecuencia y se utilizó media con desviación típica ($Media \pm DE$). Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de chi cuadrado con el programa SPSS versión 20. Se tomó un intervalo de confianza del 95% y para la interpretación de resultados se consideró $p < 0,05$ como significancia estadística (10).

RESULTADOS:

De los cuatro grupos de ratones (16 que iniciaron), 15 realizaron la prueba, dos fallecieron (grupo control droga) y uno fue introducido (grupo control droga) el día 2 de administración de sustancias.

Los parámetros espaciotemporales que analizamos con la frecuencia total de los tres grupos sometidos a estudio se muestran en la Tabla 1.

También se obtuvo el porcentaje de entrada en los brazos abiertos que fue de $25,53 \pm 11,86$, el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos fue $14,98 \pm 5,48$ y el número total de entradas fue de $6,67 \pm 0,63$.

Se calculó el promedio del porcentaje de número de entradas ($N^\circ \text{EBA} / N^\circ \text{EBA} + N^\circ \text{EBC}$) y el promedio del porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos ($TBA / 300 \times 100$) (ver Figura 1).

El número total de entradas a los brazos abiertos en el grupo droga fue de $19,75 \pm 5,90$, en el grupo control fue de $20,33 \pm 6,11$ y en el grupo que recibió la infusión de M. piperita fue de $17,5 \pm 6,34$.

DISCUSIÓN:

Teniendo en cuenta el análisis del comportamiento de los tres grupos sometidos a la prueba pudimos notar que, de un total de 280 entradas en los brazos del laberinto en cruz, solo 86 correspondieron a entradas en los brazos abiertos y lo restante a los brazos cerrados.

Además, el tiempo de permanencia fue superior en el centro del laberinto y no en los brazos, lo que nos indica que preferían

estar al aire libre y no dentro de los brazos cerrados. De estos resultados, fueron resaltantes los datos arrojados por el grupo de la *M. piperita*, pues presentaron una alta respuesta ansiolítica a las alturas, con el mayor número de entrada a los brazos abiertos en comparación con los demás grupos.

Si bien, estudios similares con drogas de la misma familia del clonazepam y con plantas medicinales con efecto ansiolítico, revelan que el mayor número de entrada a los brazos abiertos indica un menor estado ansioso, debido a que no presentan conflicto en permanecer en los brazos más protegidos (12). Otros estudios indican que la permanencia fuera de los brazos cerrados sea esta en los brazos abiertos o en el centro, indican un menor estado ansioso (13). Este último ejemplo valida el efecto esperado en nuestros ratones.

Un estudio sobre la primera entrada de los ratones a los brazos sugiere que esta primera entrada predecirá el comportamiento durante los minutos que dure la prueba (14). En nuestro estudio el 100% de los ratones fue primero hacia los brazos cerrados, pero después de unos segundos exploraron el ambiente y perdieron el miedo a su entorno; donde el 80% estaba en constante movimiento, recorriendo los brazos abiertos y cerrados.

El grupo de la droga fue el que presentó menor estado ansioso, siguiéndole el de la infusión de *M. piperita*, como ya mencionamos, administrada en dosis diferentes a dos grupos de ratones, donde se registró una menor entrada a los brazos cerrados, por lo tanto, esto es indicativo de que la infusión de esta planta posee efecto ansiolítico. Esto concuerda con los resultados arrojados en otro estudio donde se evalúa la actividad ansiolítica de

sustancias extraídas de plantas, entre ellas la menta (15).

CONCLUSIÓN:

Podemos decir que los resultados de este trabajo aceptan la hipótesis de que la infusión acuosa de hojas de menta produce efectos ansiolíticos en ratones albinos suizos machos, demostrables con la prueba del laberinto en cruz elevado ($p < 0,05$). Se encontró que la administración de la infusión aumentó en una pequeña proporción el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto que fueron las variables utilizadas para medir el nivel de ansiedad. Se requieren más estudios con el fin de continuar con su análisis fitoquímico y determinar su perfil de seguridad.

Conflictos de intereses declarados por los autores:
Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Financiamiento:

Autofinanciado.

Correspondencia:

Univ. Isabel María Jesús Morán Britos
maju.mobri@gmail.com

Recibido: 15/08/2017

Aceptado: 18/10/2017

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Virues RA. Estudio sobre ansiedad [Internet]. Revista Psicología Científica.com. 2005;7(8). Disponible en: <http://www.psicologiacientifica.com/ansiedad-estudio>.
2. Libertad MA. Aplicaciones de la psicología en el proceso salud enfermedad. Rev Cubana Salud Pública [Internet]. 2003 [citado 16 May 2015]; 29(3): 275-281. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662003000300012&lng=es.
3. Medizzine. MedizzinePortal hispano de medicina, medicamentos y plantas medicinales [Internet]. Málaga, España [actualizado 26 Jun 2010]. Disponible en: <http://www.medizzine.com/plantas2/menta.php>.
4. Miranda DA. Modelo del Comportamiento

- de Ratas en Laberinto en Cruz Elevado Basado en Redes Neuronales Artificiales. *Rev col fis (c)* [Internet]. 2009 [citado 17 Oct 2017]; 41(2):406-408. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3175928>.
5. Maraví Inga GG. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: Menta piperita (menta), Origanum vulgare (orégano) y Cymbopogon citratus (hierba luisa) sobre Streptococcus mutans ATCC 25175, Lactobacillus acidophilus ATCC 10746 y Candida albicans ATCC 90028 [tesis doctoral]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2012.
6. Castillo Angel BE. Validación farmacológica de la actividad Sedante e Hipnótica de las infusiones acuosas de las hojas de Mentha x piperita L (menta), hojas de Ternstroemiatepezapote S (trompillo), y bulbo de Allium cepa L (cebolla) en ratones machos albinos [tesis]. Guatemala: Universidad de San Carlos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007.
7. Rodríguez Yunta E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioeth.* [Internet]. 2007 [citado 6 Oct 2015];13(1):25-40. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-569X2007000100004&lng=es.
8. Escorihuela R, Fernandez-Teruel A. Modelos animales en psicopatología y psicofarmacología: del análisis experimental de la conducta a la neuro genética [Internet]. *Psicología conductual.* 1999; 6(1):165-191. Disponible en: <http://www.behavioralpsycho.com/PDFespanol/1998/art10.1.06.pdf>.
9. Eutimia.com. Salud Mental [Internet]. Buenos Aires: Eutimia.com. 2012 [citado 4 Jun 2015]. Disponible en: <http://www.eutimia.com/psicofarmacos/ansioliticos/clonazepam.htm#.VZCZdFL-HMz>.
10. Gil Velázquez JO. Efectos del extracto etanólico de hojas de pasiflora tripartita (tumbo serrano) en la ansiedad, en mus musculus var. Albinus [Internet]. Universidad de Trujillo; 2012. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/5848?show=full>.
11. Hulley S, Cummings S. *Diseño de la Investigación Clínica.* HarcourtBrace. Madrid; 1997.
12. Bonilla JA, Santa Maria AM, Toloza G, Espinoza Madrid P, Avalos JN, Nuñez Marvin J, et al. Efecto sedante, ansiolítico y toxicológico del extracto acuoso de flores de Erythrina berteroana (pito) en ratones. *Rev Cubana Plant Med* [Internet]. 2014 [citado 8 Oct 2017];19(4): 383-398. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000400010&lng=es.
13. Polanco, LA; Vargas-Irwin, C; Góngora, ME. Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad [Internet]. *Suma Psicológica.* 2011;18(2):141-148. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sumps/v18n2/v18n2a11.pdf>.
14. Celis CA, Martínez DP, Conde CA. La primera entrada en el laberinto en cruz elevado como predictor del nivel de ansiedad [Internet]. *Rev. Univ. Ind. Santander.* 2010 [citado 8 Oct 2017]; 42(3): 220-228. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072010000300005&lng=es.
15. Rejón-Orantes JDC, Placer Perdomo D, Roldán G. Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas [Internet]. *Universitas Médica* 2011 [citado 8 Oct 2017];5(2):78-89. Disponible en: <http://www.redalyc.org/>