



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



Tema: Determinación del efecto ansiolítico *in vivo* del extracto etanólico de ortiga macho (*Urtica leptophylla* Kunth) en ratones (*Mus musculus*).

Informe final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad De Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autores: Lizbeth Estefanía Doicela Pingos

Tutor: M.Sc. Danae Fernández Rivero

Ambato – Ecuador

Febrero – 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

M.Sc. Dánae Fernández Rivero

CERTIFICA:

Que el presente Informe final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 12 de enero de 2024

.....


M.Sc. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

TUTOR

AUTORÍA DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Lizbeth Estefanía Doicela Pingos, manifesté que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



.....

Lizbeth Estefanía Doicela Pingos

C.I. 1850345420

AUTORA

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....
Lizbeth Estefanía Doicela Pingos

C.I. 1850345420

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

.....

Presidente del tribunal

.....

Quim. Lander Vinicio Pérez Aldás

1802706596

.....

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

1804256905

Ambato, 06 de febrero del 2024

DEDICATORIA

A Dios por su amor incondicional.

A mis queridos padres y hermanos, quienes han sido mi apoyo incondicional desde el primer día. Han velado porque no me falte nada y siempre están dispuestos a hacer lo imposible por mi felicidad. Su amor y comprensión me han brindado la fortaleza para enfrentar cada día con determinación. Desde mi infancia, me han inculcado valores que han contribuido a forjar la persona que soy hoy.

A Gaby, mi amiga que con el tiempo se ha transformado en una hermana. Su cariño y los momentos compartidos representan mi mayor alegría. A mis amigos y maestros, quienes de diversas maneras han sido compañía valiosa en este largo y hermoso camino.

Cada uno de nosotros puede realizar pequeñas acciones con gran amor; y cuando se unen, pueden lograr algo verdaderamente maravilloso.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ser mi guía fundamental desde el inicio, brindándome fortaleza y cultivando en mí la fe que me impulsa a perseverar.

Quiero expresar un agradecimiento especial a mis padres, Jorge y Laura, quienes han sido un pilar fundamental en mi vida. Su presencia a mi lado ha sido un constante respaldo, brindándome amor incondicional, paciencia incansable, aliento constante y comprensión profunda en cada paso de mi trayectoria

A mis queridas hermanas/os Cristina, Myriam, Justin y Bryan, por su inquebrantable apoyo, cariño y por haber estado a mi lado en los momentos más cruciales de mi vida. Este logro no solo es mío, sino también de ustedes, quienes han sido una parte fundamental en mi camino.

Quiero agradecer a mi tutora, M. Sc. Danae Fernández, por su confianza y paciencia. Su profundo conocimiento me facilitó la comprensión de detalles cruciales y en resolver mis dudas, permitiendo completar con éxito mi tesis. Quiero agradecer sinceramente a mis respetados maestros, PhD. Irvin Tubón, Bioquímico Farmacéutico Benja e Ing. Giovanni Freire, por su generosidad al compartir conocimientos y su dedicación incondicional en el desarrollo de este trabajo. Su influencia ha dejado una huella imborrable en mi formación académica y personal.

Agradezco a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato por brindarme una educación excepcional y un ambiente enriquecedor, que ha dejado una marca duradera en mi formación académica y personal.

Quiero expresar un agradecimiento especial a Gabo (Gabriel), cuyo apoyo constante, respaldo moral y aliento han sido invaluable para mí. Su profundo conocimiento no solo ha contribuido a mi mejora académica, sino también a mi desarrollo personal.

Quiero agradecer a Carito por su apoyo constante durante mi vida universitaria. Su presencia ha sido una luz en los buenos y malos momentos. Aprecio profundamente su amistad y espero compartir más momentos juntos en el futuro.

A mis apreciados amigos/as Gaby L, Shir, Mela, Ket, Wen, Gonza, Cayo, Joshua, Jenny, Fer, Juanito N, Mateo Z, Juanito C, Eder, Josu L y Josu C, quiero expresar mi más sincero agradecimiento. Ustedes no solo han sido amigos, sino que han formado parte de mi segunda familia. Agradezco infinitamente por su compañía, amistad incondicional y por los gratos recuerdos que llevaré conmigo.

Agradezco a cada uno de ustedes de todo corazón y espero que la vida no nos separe.

Lizbeth Estefania Doicela Pingos

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PORTADA	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DE TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS	xi
ÍNDICE GENERAL DE TABLAS	xii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1.- MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Planteamiento del problema y justificación	1
1.1.2. Ansiedad.....	2
1.1.2.1. Relación entre el estrés y la ansiedad.....	3
1.1.2.2. Epidemiología	3
1.1.2.3. Fisiopatología.....	4
1.1.3. Tratamientos para la ansiedad.....	6
1.1.3.1. Farmacológicas	6
1.1.3.2. No farmacológicas	7
<i>Fitoterapia</i>	8
1.1.4. Ortiga macho (<i>Urtica leptophylla</i> Kunth).....	10
1.1.4.1. Género <i>Urtica</i>	11
<i>Composición fitoquímica</i>	11

<i>Usos terapéuticos</i>	13
1.1.5. Métodos de extracción vegetal.....	14
1.1.5.1. Infusión	14
1.1.5.2. Extracción Soxhlet.....	14
1.1.5.3. Maceración.....	15
1.1.5.4. Métodos de extracción moderna	15
1.1.6. Modelos animales en el estudio de la ansiedad.....	16
1.1.6.1. Evaluación de la ansiedad en <i>Mus musculus</i>	17
1.2. Objetivos	19
1.2.1. Objetivo General	19
1.2.2. Objetivos Específicos.....	19
CAPITULO II.- METODOLOGÍA	20
2.1. Materiales	20
2.1.1. Equipos de laboratorio	20
2.1.2. Reactivos	20
2.1.3. Material fungible.....	21
2.2. Métodos	22
2.2.1. Cuantificación de la concentración de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto etanólico	22
2.2.1.1. Recolección de ortiga macho (<i>Urtica leptophylla</i> Kunth).....	22
2.2.1.2. Preparación del material vegetal.....	22
2.2.1.3. Preparación del extracto etanólico.....	23
2.2.1.4. Cuantificación de fenoles.....	23
2.2.1.5. Cuantificación de flavonoides	24
2.2.1.6. Actividad antioxidante del extracto etanólico	24
2.2.2. Análisis de la capacidad ansiolítica del extracto etanólico <i>in vivo</i> mediante la técnica de puente de cruz elevada	25

2.2.2.1.	Modelo animal	25
2.2.2.2.	Aprobación ética	26
2.2.2.3.	Prueba de comportamiento	26
2.2.3.	Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> del extracto etanólico en la especie animal mediante la técnica de DPPH	27
2.2.3.1.	Dissección del hipocampo.....	27
2.2.3.2.	Preparación de la muestra	28
2.2.3.3.	Medición de la actividad antioxidante	28
2.2.3.4.	Cuantificación de proteínas totales	28
2.2.3.5.	Diseño experimental	29
CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		31
3.1.	Análisis y discusión de los resultados	31
3.1.1.	Rendimiento del extracto etanólico.....	31
3.1.2.	Determinación de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante del extracto etanólico	33
3.1.4.	Efecto de <i>U. leptophylla</i> Kunth sobre los radicales libres del hipocampo.....	42
3.1.5.	Efecto de <i>U. leptophylla</i> Kunth sobre los niveles de proteínas del hipocampo.....	45
CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		49
3.1.6.	Conclusiones	49
3.1.7.	Recomendaciones	50
MATERIAL DE REFERENCIA		51
Referencias Bibliográficas		51
Anexos		79

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1.	38
Porcentaje del número de entradas de <i>Mus musculus</i> a brazos abiertos.	38
Figura 2.	39
Porcentaje del tiempo en entradas de <i>Mus musculus</i> a brazos abiertos.	39
Figura 3.	44
Actividad antioxidante del hipocampo del ratón en el ensayo de eliminación de radicales libres de DPPH.....	44
Figura 4.	46
Cuantificación proteica del hipocampo del ratón en el ensayo por Bradford.	46

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1.....	34
Cuantificación de contenido de fenoles totales y flavonoides totales de <i>Urtica leptophylla</i> Kunth.	34
Tabla 2.....	36
Capacidad antioxidante de <i>Urtica leptophylla</i> Kunth.....	36

RESUMEN EJECUTIVO

La investigación de la evaluación ansiolítica de una planta nativa del Ecuador, como el análisis del potencial ansiolítico del extracto etanólico de *Urtica leptophylla* Kunth, es crucial en la salud mental y la conservación de la biodiversidad. En un mundo donde los trastornos de ansiedad afectan a un número creciente de personas, encontrar alternativas naturales y efectivas es vital. Además, esta investigación fusiona el conocimiento tradicional con la ciencia moderna para beneficio de las sociedades y el medio ambiente, resaltando la riqueza de la flora ecuatoriana y su potencial para el desarrollo sostenible.

La metodología aplicada incluyó pruebas fitoquímicas que revelaron la presencia significativa de fenoles y flavonoides, respaldando la actividad antioxidante del extracto. El uso del ensayo de Laberinto Elevado en Cruz en ratones (*Mus musculus*) para evaluar el potencial ansiolítico del extracto de *Urtica leptophylla* Kunth. La exploración de la respuesta del hipocampo de los ratones mediante pruebas bioquímicas (DPPH y Bradford) después de la fase comportamental proporcionaron información valiosa sobre la capacidad del extracto para contrarrestar el estrés oxidativo en el cerebro generado por el estrés por inmovilización.

Los resultados sugieren un efecto ansiolítico positivo comparable al clonazepam, además de propiedades neuroprotectoras gracias a su capacidad antioxidante. Estos hallazgos abren nuevas vías para investigar y aplicar compuestos naturales en el tratamiento de enfermedades mentales y la protección cerebral contra el estrés oxidativo. En resumen, el estudio ofrece una comprensión integral de las propiedades del extracto y su potencial para tratar trastornos de ansiedad y la protección cerebral.

Palabras clave: Biotecnología farmacéutica, fitomedicamentos, extractos vegetales, extracto etanólico, ansiedad, plantas nativas, *Urtica leptophylla* Kunth.

ABSTRACT

The research on the anxiolytic evaluation of a native plant from Ecuador, such as the analysis of the anxiolytic potential of the ethanolic extract of *Urtica leptophylla* Kunth, is crucial for mental health and biodiversity conservation. In a world where anxiety disorders affect an increasing number of people, finding natural and effective alternatives is vital. Additionally, this research merges traditional knowledge with modern science for the benefit of societies and the environment, highlighting the richness of Ecuadorian flora and its potential for sustainable development.

The methodology employed included phytochemical tests that revealed the significant presence of phenols and flavonoids, supporting the antioxidant activity of the extract. The use of the Elevated Plus Maze test in mice (*Mus musculus*) to assess the anxiolytic potential of the extract from *Urtica leptophylla* Kunth. The exploration of the mice hippocampus response through biochemical tests (DPPH and Bradford) after the behavioral phase provided valuable insights into the extract's ability to counteract oxidative stress in the brain induced by immobilization stress.

The results suggest a positive anxiolytic effect comparable to clonazepam, in addition to neuroprotective properties due to its antioxidant capacity. These findings pave the way for investigating and applying natural compounds in the treatment of mental illnesses and brain protection against oxidative stress. In summary, the study provides a comprehensive understanding of the extract's properties and its potential for treating anxiety disorders and protecting the brain.

Keywords: Pharmaceutical biotechnology, phytomedicines, plant extracts, ethanolic extract, anxiety, native plants, *Urtica leptophylla* Kunth.

CAPÍTULO 1.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Planteamiento del problema y justificación

Los trastornos mentales se caracterizan por una alteración significativa en la cognición, la regulación emocional o el comportamiento de un individuo, lo cual está asociado con angustia o deterioro en importantes áreas cerebrales (**WHO, 2022a**). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019, aproximadamente 970 millones de personas en todo el mundo sufría de trastornos mentales, siendo la ansiedad (31%) y la depresión (28,8%) las afecciones más comunes (**WHO, 2022a**). Durante la pandemia de COVID-19 en 2020, se observó un notable aumento del 26% y 28% en los casos diagnosticados de ansiedad y depresión, respectivamente (**WHO, 2022b**). Un estudio realizado en Ecuador por **Namcela et al. (2022)**, reveló que, hasta agosto de 2022, el 46% de la población presentaba trastornos de ansiedad, según los resultados obtenidos a través de la prueba Psicológico DASS-21.

Los ansiolíticos son medicamentos ampliamente utilizados para prevenir los síntomas de ansiedad, controlar los trastornos de ansiedad, la sedación y el tratamiento del insomnio (**Fuentes, Ray & Holstege, 2014**). Las benzodiazepinas (BZD) son los fármacos más comúnmente utilizados debido a sus efectos depresores en el sistema nervioso central (SNC). Estas sustancias atraviesan rápidamente la barrera hematoencefálica para afectar al neurotransmisor inhibitor ácido gamma-aminobutírico (GABA) y producir efectos sedantes (**Edinoff et al., 2021**).

Sin embargo, los ansiolíticos como el diazepam presentan efectos secundarios, tales como potencial adictivo, confusión, náuseas, problemas respiratorios y somnolencia, además de provocar deterioro cognitivo con el uso prolongado (**Bounds & Nelson, 2023; Crowe & Stranks, 2018**). Por lo tanto, generalmente se reducen las dosis y se recurre un tratamiento complementario con otros medicamentos análogos a la misma familia de BZD como el clonazepam (**Edinoff et al., 2021**).

Debido a los efectos adversos asociados con los medicamentos sintéticos disponibles en la actualidad, la búsqueda de nuevos productos terapéuticos para tratar trastornos neurológicos, como la ansiedad, ha llevado a un progreso constante en la investigación de plantas medicinales a nivel mundial (**Kenda et al., 2022**). Numerosas plantas utilizadas tradicionalmente han demostrado poseer propiedades farmacológicas con un gran potencial para su aplicación terapéutica en el tratamiento de trastornos del SNC (**Carlini, 2003; Doukkali et al., 2015; Lundstrom, Pham & Dinh, 2017**).

La lavanda, lúpulo, maypop, toronjil y valeriana han demostrado aliviar los trastornos neurológicos leves, especialmente la depresión, la ansiedad y el estrés (**Kenda et al., 2022**). Además, se ha observado en varios estudios que las especies del género *Urtica*, pertenecientes a la familia Urticaceae, tienen efectos ansiolíticos, principalmente ortiga menor (*Urtica urens*) (**Doukkali et al., 2015**) y ortiga mayor (*Urtica dioica*) (**Patel et al., 2018**). En Ecuador, existen 6 especies pertenecientes a esta familia, de las cuales 4 son nativas. La ortiga macho (*Urtica leptophylla*) es la más conocida y tradicionalmente se utiliza para tratar trastornos nerviosos (**De la Torre et al., 2008**). Sin embargo, aún no se ha realizado un estudio que verifique su efecto ansiolítico.

Por tanto, la investigación de la ortiga macho para el tratamiento de la ansiedad reviste una gran importancia cultural. Su estudio y validación científica podrían contribuir a preservar y promover el conocimiento de las prácticas tradicionales de la medicina natural, ofreciendo una nueva opción atractiva de tratamiento para aquellas personas que sufren de ansiedad y buscan alternativas naturales a los medicamentos sintéticos. Asimismo, este proyecto de investigación busca no solo obtener resultados concretos, sino también sentar las bases para investigaciones futuras que puedan generar un impacto positivo.

1.1.2. Ansiedad

La ansiedad es una respuesta emocional natural asociada al miedo que se produce ante situaciones estresantes o amenazantes (**Dean, 2016**). Sin embargo, cuando esta sensación se vuelve persistente o abrumadora, y empieza a interferir en las actividades diarias, se puede considerar como un trastorno de ansiedad (**Penninx et al., 2021**). La

etiología de trastornos de ansiedad se basa en la interacción de factores biopsicosociales. Estos incluyen elementos genéticos, influencias del entorno, situaciones estresantes, desequilibrio químico en el cerebro, aspectos psicológicos, así como el consumo de medicamentos o sustancias ilícitas (**Chand & Marwaha, 2023**).

En el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5) y la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-11), se identifican diferentes tipos de trastornos de ansiedad (F41.0). Este incluye el trastorno de pánico (TP) (F41.0), trastorno de ansiedad generalizada (TAG) (F41.1), trastorno de estrés postraumático (TEPT), ansiedad y depresión mixtas (F41.2), trastorno de ansiedad por separación, mutismo selectivo, trastorno de ansiedad social (TAS), fobia específica (FE), fobia social y agorafobia (**Lai, 2020; Ströhle, Gensichen & Domschke, 2018**).

1.1.2.1. Relación entre el estrés y la ansiedad

El estrés se caracteriza como una reacción que se manifiesta en los ámbitos fisiológico y psicológico cuando la estabilidad de la homeostasis se ve alterada por factores estresantes (internos o externos) (**Chrousos, 2009; Lu, Wei & Li, 2021**). Asimismo, tiene un papel relevante en el funcionamiento normal del sistema, favoreciendo la adaptabilidad. Sin embargo, cuando el estrés se prolonga, conlleva a un desequilibrio en los sistemas inmunológico, neurohormonal, cardiovascular, gastrointestinal y nervioso (**Hassoulas, 2021; Mcewen, 2004**).

De acuerdo con **Daviu et al. (2019)**, los complejos circuitos neuronales que regulan el estrés como la ansiedad evidencian una estrecha y mutua relación entre las experiencias de estrés y ansiedad, ya sea en condiciones normales o en contextos patológicos. Tanto el estrés agudo como el crónico producen perfiles variables de deficiencias fisiológicas, deterioro en la función de la memoria y manifestaciones conductuales análogas a la ansiedad, además, los eventos estresantes pueden incrementar la susceptibilidad a la ansiedad (**Daviu et al., 2019; Fee et al., 2020; Mcewen, 2004; McLaughlin & Hatzenbuehler, 2009**).

1.1.2.2. Epidemiología

Los trastornos de ansiedad presentan un impacto de gran relevancia en la vida de los pacientes y son considerados enfermedades crónicas significativas, siendo las fobias específicas el de tipo más común (Ströhle, Gensichen & Domschke, 2018). Según la OMS en 2015, estos trastornos ocuparon el sexto lugar a nivel mundial, tanto en enfermedades mentales como somáticas, en términos de años vividos con discapacidad (YLD, por sus siglas en inglés) (WHO, 2017).

En relación a la pandemia de COVID-19, una revisión sistemática y meta-análisis llevado a cabo por Zhang et al. (2022) en América Latina, reveló que la prevalencia combinada de ansiedad fue del 35%. Además, se encontró mayor presencia en América del Sur en comparación con América Central, así como en países de habla portuguesa que de habla española. En Ecuador durante la pandemia, un estudio transversal realizado por Mautong et al. (2021), reveló que la ansiedad era uno de los problemas de salud mental más común, afectando al 30,7% de la población general, con niveles de moderados a muy graves. Sin embargo, la prevalencia de la ansiedad fue aún mayor entre los pacientes de COVID-19 que la población general (Paz et al., 2020).

Además, las poblaciones más jóvenes presentan un riesgo elevado de desarrollar depresión y ansiedad tras pasar por situaciones estresantes y traumáticas (Gerstner et al., 2020). Adicionalmente, existe una mayor prevalencia de trastornos de ansiedad en mujeres en comparación con hombres, tanto en la población adulta como en niños y adolescentes (Farhane-Medina et al., 2022).

1.1.2.3. Fisiopatología

La fisiopatología de la ansiedad es un tema complejo y aún no se comprende totalmente. Sin embargo, se postula que la norepinefrina (NE), la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), la dopamina (3,4-dihidroxifenetilamina, DA) y el GABA son mediadores neuroquímicos significativos de la ansiedad en el SNC, además, la amígdala desempeña un papel fundamental en los procesos de ansiedad, así como el hipocampo (Babaev, Piletti Chatain & Krueger-Burg, 2018; Chand & Marwaha, 2023).

El neurotransmisor GABA, esencial en el SNC, desempeña un papel fundamental al moderar la hiperactividad neuronal relacionada con la ansiedad, el estrés y el miedo (**Huang et al., 2023**). Las células nerviosas que emplean GABA se localizan en áreas cerebrales como el tálamo, hipotálamo, hipocampo, ganglios basales, amígdala y tronco del encéfalo (**Nuss, 2015; Ochoa-de la Paz et al., 2021**). En individuos con trastornos de ansiedad, el incremento de la actividad en las zonas cerebrales vinculadas al procesamiento emocional podría ser resultado de una disminución en la función inhibitoria del GABA o de un aumento en la transmisión excitatoria del glutamato (**Allen, Sabir, & Sharma, 2023; Martin et al., 2009**).

La NE, 5-HT y DA son neurotransmisores que se encuentran en varias regiones del SNC, desempeñando papeles cruciales en la regulación del estado de ánimo, las emociones y la función cognitiva. La NE se sintetiza principalmente en el locus coeruleus del tronco del encéfalo, 5-HT, se sintetiza en los núcleos del rafe del tronco del encéfalo, mientras que, DA se encuentra en varias regiones del SNC, incluida la sustancia negra y el área tegmental ventral (**Teleanu et al., 2022**).

Las alteraciones en la señalización de los neurotransmisores 5-HT, NE y DA pueden originarse por una disminución en la liberación de estos neurotransmisores en las terminaciones presinápticas, o por transducciones aberrantes de señales. Estos cambios contribuyen significativamente a la regulación o funcionamiento de receptores y el deterioro en el procesamiento intracelular, influyendo en el estado de ánimo y la motivación en personas con trastornos de ansiedad (**Albert, Vahid-Ansari & Luckhart, 2014; Liu, Zhao & Guo, 2018**).

La amígdala, situada en los lóbulos temporales medios, consta de múltiples núcleos, siendo dos de ellos relacionados con la ansiedad: el complejo de amígdala basolateral (BLA) y el complejo de amígdala centromedial, especialmente el núcleo central (CeA). Estos núcleos involucran neurotransmisores como GABA, NE, DA, acetilcolina, neuropéptido Y, entre otros (**Babaev, Piletti Chatain & Krueger-Burg, 2018; Linsambarth et al., 2017; Nuss, 2015**).

El hipocampo, situado en los lóbulos temporales medios, se asocia a la ansiedad por su influencia en el procesamiento emocional y regular el eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (HPA), así como en la neurogénesis y la plasticidad sináptica (**Ghasemi et al., 2022; Sha et al., 2013**). La interacción con la amígdala influye en la regulación emocional y su papel en la formación de recuerdos ansiogénicos impacta en la experiencia de la ansiedad. Además, el hipocampo ayuda con diversas regiones cerebrales para ajustar los niveles de ansiedad en respuesta a condiciones estresantes, y se ha notado una conexión entre la ansiedad y una mayor excitabilidad neuronal en el hipocampo (**Ghasemi et al., 2022; Mahan & Ressler, 2012; Sha et al., 2013**).

1.1.3. Tratamientos para la ansiedad.

Al considerar el tratamiento, es crucial evaluar la seriedad del trastorno, preferencia informada del paciente, duración y efectividad previstas, posibles efectos secundarios y disponibilidad del tratamiento. Si el tratamiento actual es ineficaz, se debe explorar alternativas o combinación de tratamientos (**Ströhle, Gensichen & Domschke, 2018**).

1.1.3.1. Farmacológicas

Se sugiere priorizar el uso de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y de serotonina y norepinefrina (IRSN) como tratamientos iniciales debido a su equilibrio favorable entre beneficios y riesgos. Algunos de estos actúan como inhibidores de las enzimas del citocromo P450 y se emplean para tratar FE, TAG Y TAS (**Bandelow, Michaelis & Wedekind, 2017; Garakani et al., 2020**). Otros fármacos, como la pregabalina, tienen efectos sedantes al modular los canales de calcio en la subunidad alfa-2 delta de los canales de calcio dependientes del voltaje (**Baldwin et al., 2013**). La buspirona, clasificada como azapironas, actúa como agonista del receptor 5-hidroxitriptamina 1A (5HT_{1A}) y se usa principalmente para el TAG, siendo su efecto ansiolítico de aparición retardada (**Apeldoorn et al., 2023; Wilson, T., & Tripp, 2023**). Aunque los antidepresivos tricíclicos (ATC) presentan una eficacia similar a la de los ISRS, su prescripción ha disminuido debido a preocupaciones sobre efectos secundarios (**Garakani et al., 2020**).

Las BZD actúan como agonistas de GABA-A, generando efectos sedantes. Se usan comúnmente para tratar el TP y TAG, así como ataques de pánico y ansiedad de aparición aguda (Edinoff et al., 2021; Susman & Klee, 2005). Ofrece un alivio rápido de los síntomas y se usan ampliamente para problemas de sueño, ansiedad, espasticidad asociada con trastornos del SNC, relajación muscular y epilepsia (Edinoff et al., 2021). Debido a preocupaciones por adicción y abstinencia, los ISRS se han vuelto la terapia principal para estas condiciones. No obstante, por su retraso en el inicio de acción, las BZD continúan siendo ampliamente recetadas para tratar la ansiedad (Quagliato, Freire & Nardi, 2018).

Además de los fármacos mencionados, se encuentran en uso actual fármacos como antidepresivos mixtos, antihistamínicos, agentes alfa y beta adrenérgicos, antipsicóticos. También, se está investigando y emergiendo nuevos medicamentos, tales como agentes serotoninérgicos, moderadores de glutamato, neuropéptidos y neuroesteroides (Garakani et al., 2020). Sin embargo, los medicamentos para la ansiedad tienen la desventaja de causar efectos adversos, variando según el fármaco y duración del tratamiento. Estos efectos pueden incluir malestar estomacal, confusión, náuseas, dolor de cabeza, sequedad bucal, diarrea, estreñimiento, debilidad muscular, aumento de peso, retención urinaria, arritmias, mortalidad por sobredosis, disfunción sexual y, con el uso prolongado, la posibilidad de dependencia y síntomas de abstinencia (Bandelow, Michaelis & Wedekind, 2017; Garakani et al., 2020).

1.1.3.2. No farmacológicas

Existen varios métodos no farmacológicos que pueden aliviar los síntomas de la ansiedad, como diferentes terapias, cambios en la dieta y estilo de vida. La terapia cognitivo-conductual (TCC) destaca como la psicoterapia con mayor respaldo empírico y recomendación más sólida. Esta técnica muestra su eficacia en una amplia variedad de trastornos mentales, incluyendo aquellos relacionados con la ansiedad (Kaczurkin & Foa, 2015; Ströhle, Gensichen & Domschke, 2018).

Aunque la TCC tiene respaldo científico como tratamiento estructurado para trastornos de ansiedad, su acceso puede verse limitado por factores como la disponibilidad de

profesionales cualificados y aspectos económicos. Estos obstáculos dificultan un tratamiento efectivo en personas con altos niveles de ansiedad, generando la demanda de alternativas terapéuticas (**Ströhle, Gensichen & Domschke, 2018**). En años recientes, se han investigado y adoptado varios enfoques de tratamiento en la práctica clínica, incluyendo la terapia metacognitiva, terapia de aceptación y compromiso, prácticas basadas en mindfulness y técnicas de estimulación cerebral no invasivas, como la estimulación magnética transcraneal repetitiva (EMTr) o estimulación transcraneal de corriente continua (tDCS) (**Ströhle, Gensichen & Domschke, 2018**).

Igualmente, se encuentran tratamientos que implican actividad física y ejercicio, los cuales son económico y presentan escasos efectos adversos, se recomienda su uso en combinación con terapias principales, aunque es poco común en la práctica clínica habitual. Estudios han demostrado que el ejercicio disminuye los síntomas de ansiedad y reduce la probabilidad de ser diagnosticado con un trastorno de ansiedad en comparación con aquellos que llevan un estilo de vida sedentario (**Aylett, Small & Bower, 2018; Henriksson et al., 2022; Stonerock et al., 2015; Strickland & Smith, 2014; Ströhle, 2019**).

Las limitaciones de estos tratamientos incluyen la posibilidad de una demora en observar resultados y su eventual incapacidad para controlar eficazmente síntomas graves de ansiedad o ataques de pánico, lo que puede requerir su complemento con fármacos. Además, tanto pacientes como el sistema de atención médica enfrentan obstáculos relacionados con el tiempo y el costo asociados a estos tratamientos no farmacológicos (**Anthierens et al., 2010; Cottraux, 2002; Mangolini et al., 2019**).

Fitoterapia

Otro enfoque no farmacológico es la fitoterapia, definida por la OMS, que emplea plantas medicinales y sus derivados para prevenir o tratar enfermedades, aprovechando el efecto terapéutico derivado de la concentración de sus componentes químicos con propiedades farmacológicas (**Allegra et al., 2023**). Las plantas se han vuelto más populares como medicina por su origen natural, facilidad de adquisición y menor costo, siendo una alternativa valiosa ante los efectos secundarios o resistencia a los

fármacos convencionales (**Abubakar & Haque, 2020**). En los últimos 15 años, ha aumentado el interés en la investigación de más de 30 medicamentos a base de hierbas para tratar la depresión y la ansiedad (**Yeung et al., 2018**).

Varias hierbas han sido estudiadas por su potencial para reducir la ansiedad al interactuar con distintos receptores del SNC, con un bajo riesgo de efectos secundarios graves. Algunas de estas incluyen lavanda, ashwagandha, manzanilla, la valeriana, pasiflora, galphimia, cannabis, equinácea, ginkgo, manzanilla, bálsamo de limón, azafrán, kava, centella, lúpulo, melisa, escutelaria, maypop y toronjil. Estudios previos han mostrado su interacción con el sistema GABA, y se han realizado ensayos clínicos en humanos para evaluar su eficacia (**Awad et al., 2007; Garakani et al., 2020; Kenda et al., 2022; Lundstrom, Pham & Dinh, 2017; Mangolini et al., 2019; Savage et al., 2018; Yeung et al., 2018**).

El Kava Kava (*Piper methysticum*), una planta ampliamente estudiada nativa de las islas tropicales, ha demostrado reducir la ansiedad a corto plazo. Contiene kavapironas, compuestos que se cree que tiene efectos ansiolíticos, posiblemente influyendo en los canales de sodio y calcio, o a través de la acción sobre los receptores GABA-A (**Garakani et al., 2020; Smith & Leiras, 2018; Yeung et al., 2018**). Se han realizado numerosos estudios positivos sobre terapias naturales para tratar el TAG, con especial enfoque en la manzanilla (*Matricaria recutita*), se plantea que esta planta puede tener efectos ansiolíticos e inductores de sueño al interactuar sus flavonoides y apigenina con los receptores GABA-A en el cerebro, demostrando su eficacia hasta las 38 semanas (**Hieu et al., 2019; Mao et al., 2016**).

Tanto estudios clínicos como en animales han respaldado el efecto ansiolítico de la lavanda (*Lavandula angustifolia*) en diferentes circunstancias. Se ha demostrado que la lavanda es efectiva al ser inhalada, usada como aceite de masaje o ingerida por vía oral. Se sugiere la administración oral como tratamiento a largo plazo, y la inhalación para un uso a corto plazo (**Chioca et al., 2013; Shamabadi et al., 2023**). La valeriana (*Valeriana officinalis*) es famosa por sus efectos calmantes, en pacientes con trastorno de ansiedad, un extracto de raíz de valeriana mostró efectos ansiolíticos similares a los del diazepam (**Donelli et al., 2019; Kasper, et al., 2014; Kasper et al., 2016**).

Se ha sugerido que especies del género *Urtica* poseen propiedades ansiolíticas. Evidenciado que la ortiga mayor (*Urtica dioica*), es eficaz en reducir la ansiedad, principalmente por sus compuestos fitoquímicos como la rutina, que también influyen en la reducción del daño cerebral y la mejora en el sueño (Alizadeh et al., 2021; Patel et al., 2018). La ortiga menor (*Urtica urens*) también exhibe efectos ansiolíticos, comparables a los del diazepam (Doukkali et al., 2015; Doukkali et al., 2016b).

Se ha observado que los efectos de las hierbas, en comparación con los medicamentos estándar, no son tan potentes, pero suelen ser más seguros (Yeung et al., 2018). A pesar del interés creciente por los agentes naturales, la información disponible sobre la mayoría de estas hierbas es limitada, afectando la evidencia de sus beneficios (Bandelow, Michaelis & Wedekind, 2017; Garakani et al., 2020). Por lo tanto, según Yeung et al. (2018), es crucial enfocar los esfuerzos de investigación futuros en comprender los mecanismos de acción, evaluar la seguridad y eficacia de estas hierbas.

1.1.4. Ortiga macho (*Urtica leptophylla* Kunth)

La especie *U. leptophylla* pertenece al reino Plantae, filo Tracheophyta, subfilo Angiospermae, clase Magnoliopsida, orden Rosales, familia Urticaceae, género *Urtica*, y tiene el nombre científico de autoría de Kunth (Romoleroux et al., 2019).

Es una especie ampliamente distribuida en Sudamérica, principalmente en el bioma tropical montano (Große-Veldmann, 2017). Esta planta herbácea es nativa de Ecuador y tiene una identidad cultural asociada con comunidades Kichwa de la Sierra y Mestiza. Se encuentra especialmente en las provincias de Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura, Cañar, Napo y Tungurahua, en un hábitat natural abarca latitudes de 1500 a 3500 m.s.n.m (De la Torre et al., 2008; Romoleroux et al., 2019). Además, se le conoce por varios nombres, como Kari chini y yana chini en kichwa, así como ortiga macho, ortiga bravo, ortiga blanca, ortiga de 24 horas y ortiga silvestre (De la Torre et al., 2008).

De acuerdo con De la Torre et al. (2008) la ortiga macho tiene varios usos como alimento, social y medicinal, destacando su notable efecto en el tratamiento de

desórdenes del sistema nervioso. Sus hojas, raíces y flores se utilizan en infusión o jugos para tratar condiciones como reumatismo, artritis, problemas hepáticos, renales, dolores de cabeza, estómago y espalda, además, es reconocida por sus propiedades purificadoras de la sangre (**Romoleroux et al., 2019**). Las hojas trituradas se emplean como cataplasmas para calmar dolores faciales (**Romoleroux et al., 2019**).

1.1.4.1. Género *Urtica*

Urticaceae es una familia de plantas con flores que pertenece al orden Rosales. Esta familia incluye alrededor de 54 géneros y alrededor de 2,600 especies en todo el mundo. Algunos géneros destacados de la familia Urticaceae son *Urtica*, *Laportea*, *Pilea*, *Boehmeria* y *Hesperocnide* (**De la Torre et al., 2008**).

El género *Urtica* se encuentra ampliamente distribuido por todas las regiones del mundo, abarcando todos los continentes y la mayoría de las islas extratropicales, a excepción de la Antártica (**Grosse-Veldmann et al., 2016**). Es un género muy común, presente en hábitats modificados por la actividad humana y es ampliamente utilizada para diversos propósitos, como alimento, medicina, producción de fibras, alimentación animal, fitorremediación, entre otros fines (**Große-Veldmann, 2017; Grosse-Veldmann et al., 2016**). Muchas especies de este género poseen pelos urticantes y se les conoce como ortigas. Aunque a menudo se consideran maleza, también pueden habitar en una variedad de hábitats naturales, incluyendo montañas en Macaronesia, África Oriental y en los Andes, así como áreas de páramos y puna altoandinos superiores a 4500 m.s.n.m (**Große-Veldmann, 2017**).

Además, *Urtica* suele encontrarse en sitios con abundantes nutrientes, especialmente en suelos con niveles moderados a altos de nitrógeno (N) y fósforo (P), mostrando preferencia por áreas con alta disponibilidad de agua (**Hejeman et al., 2012**). Sin embargo, también tiene la capacidad de crecer en suelos calcáreos secos y expuestos, así como en bosques pedregosos, pantanos húmedos de primavera y suelos ácidos de sotobosque de bosques caducifolios y coníferas sombrías (**Große-Veldmann, 2017**).

Composición fitoquímica

Los fitoquímicos son compuestos vegetales no nutritivos que se producen naturalmente en las plantas a través de procesos metabólicos internos, los cuales tienen el potencial de reducir el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades crónicas (**Huda, Mohammed & Imad, 2015; Ibrahim et al., 2018**). La composición química de las plantas puede variar debido a múltiples factores, como el genotipo, variedad, condiciones ambientales, fase de crecimiento, tipo de suelo, momento de recolección, almacenamiento, tratamiento y procesamiento. Como resultado, se han identificado más de un centenar de compuestos distintos en el análisis fitoquímico de las diversas especies de *Urtica* (**Augspole et al., 2017; Ibrahim et al., 2018; Kregiel, Pawlikowska & Antolak, 2018; Rafajlovska et al., 2013**).

En estudios experimentales se ha notado que los tratamientos derivados de plantas o sus extractos, conocidos como fitomedicamentos, pueden desencadenar efectos específicos debido a componentes como alcaloides, terpenoides/saponinas y polifenoles. Se cree que estas moléculas desempeñan roles diversos en el sistema nervioso central (SNC); entre ellos, los flavonoides se destacan por su capacidad como reguladores positivos de los receptores GABA-A (**Savage et al., 2018**).

Las hojas de ortiga contienen una amplia variedad de componentes, como carotenoides, terpenoides, ácidos grasos, aminoácidos esenciales, diferentes compuestos polifenólicos, taninos, clorofila, carbohidratos, vitaminas, esteroides, isolectinas, polisacáridos y minerales (**Kregiel, Pawlikowska & Antolak, 2018**). Los vegetales que tienen altas concentraciones de fenoles y flavonoides poseen propiedades antioxidantes, utilizadas para tratar enfermedades asociadas con el envejecimiento, como Parkinsonismo, Alzheimer, depresión y ansiedad (**Sasidharan et al., 2011**). Se encontró un mayor contenido de compuestos fenólicos en las hojas de ortiga *U. dioica* en comparación con las de diente de león, siendo la rutina el componente fenólico predominante (**Ghaima, K., Hashim, N., & Ali, 2013; Vajić et al., 2015**). Según **Patel et al. (2018)**, el análisis fitoquímico del extracto de *U. dioica* reveló la presencia de quercetina, esculetina, ácido gentísico, escopoletina y rutina en el extracto de hojas, sugiriendo su posible contribución en la reducción de la ansiedad.

Actividad biológica

Varias especies de *Urtica* exhiben una fuerte capacidad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, superando la eficacia de ciertos compuestos antimicrobianos estándar, destacando *U. dioica*, *U. pilulífera* y *U. urens* (Kregiel, Pawlikowska & Antolak, 2018). Estas plantas, abundantes en vitaminas y minerales, se consumen de diversas maneras, como harina, infusiones, cocidas, jugos, licores y quesos, entre otras formas. Además, se utilizan como suplemento dietético para animales, respaldando la actividad antimicrobiana, fortaleciendo el sistema inmunológico y reduciendo el estrés (Esposito et al., 2019; Kregiel, Pawlikowska & Antolak, 2018). Asimismo, se ha observado su acción antiinflamatoria, antidiabética, citotóxica, antihiperplasia prostática benigna, así como propiedades hepatoprotectoras, neuroprotectoras y antioxidantes en *U. dioica*, *U. urens*, *U. fissa* y *U. pilulifera* (Assaf et al., 2020; Semwal et al., 2023).

Usos terapéuticos

U. dioica ofrece alivio para los síntomas de la osteoartritis y el malestar en las articulaciones, especialmente en áreas como rodillas, manos, columna y caderas. Además de ser reconocida por sus propiedades antiinflamatorias, demostrando beneficios en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, de igual forma *U. mairei*, *U. parviflora*, *U. ardens*, *U. triangularis*, *U. hyperborea*, *U. flabellata*, *U. urens* y *U. magellanica*. De igual forma, diversas especies de *Urtica*, se usan para combatir alergias y sus infusiones son útiles para tratar hemorragias nasales y menstruales (*U. urens*, *U. dioica*), cuidado del cabello (*U. membranacea*, *U. ardens*), anemia (*U. urens*, *U. ardens*), diabetes (*U. massaica*, *U. parviflora*), estimular la lactancia (*U. hyperborea*, *U. dioica*) y problemas respiratorios (*U. morifolia*, *U. urens*, *U. atrichocaulis*, *U. dioica*). Se le atribuyen propiedades antioxidantes (*U. dioica*), antiulcerosas (*U. incisa*) y protectoras cardiovasculares (*U. thunbergiana*, *U. urens*). Además, se ha observado su potencial para combatir el cáncer (*U. ardens*, *U. dioica*), malestares estomacales (*U. leptophylla*, *U. magellanica*, *U. morifolia*; *U. membranacea*, *U. hyperborea*, *U. triangularis*, *U. ardens*), condiciones de la piel (*U. membranacea*, *U. triangularis*), efecto ansiolítico (*U. dioica* y *U. urens*)

y antidepresivo (*U. dioica*), entre otras propiedades. (Dar et al., 2013; Doukkali et al., 2015; Esposito et al., 2019; Ibrahim et al., 2018; Jerves-Andrade et al., 2014; Khare et al., 2012; Kregiel, Pawlikowska & Antolak, 2018; Patel et al., 2018).

1.1.5. Métodos de extracción vegetal

La extracción de plantas medicinales comprende el proceso de separación de materiales vegetales activos o metabolitos secundarios (Abubakar & Haque, 2020). Se utilizan varios métodos, como la extracción con disolventes, la destilación mediante vapor o agua para obtener aceites esenciales, el prensado que extrae aceites, grasas y ceras al comprimir el material vegetal, y la sublimación, que implica el cambio directo del estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. Entre estos, el método más prevalente es la extracción con disolvente (Abubakar & Haque, 2020; Balaman, 2019; Gronbach et al., 2021; Kapadia et al., 2022; Zhang, Lin & Ye, 2018).

La selección del disolvente se basa en varios factores, como el tipo de planta, la parte específica que se pretende extraer, naturaleza de los compuestos bioactivos, disponibilidad, solubilidad, costo y la seguridad. Por lo general, los solventes polares como metanol, agua y etanol, se usan para extraer compuestos polares, mientras que los solventes no polares, como diclorometano y hexano, se emplean para extraer compuestos no polares (Abubakar & Haque, 2020; Zhang, Lin & Ye, 2018).

1.1.5.1. Infusión

Este método, similar a la maceración, consiste en remojar el material vegetal en agua hervida o fría y luego se deja reposar en el líquido durante un corto período de tiempo, utiliza solventes orgánicos que extrae material vegetal que es volátil. Se pueden extraer compuestos bioactivos, como alcaloides, flavonoides, polifenoles, y otros elementos solubles en agua (Fotsing et al., 2021; Abubakar & Haque, 2020).

1.1.5.2. Extracción Soxhlet

Este procedimiento implica el empleo de un extractor Soxhlet de vidrio, introduciendo el material vegetal en una bolsa porosa dentro de la cámara de extracción y añadiendo el disolvente al matraz inferior. El calor evapora el disolvente, transportando el fármaco a través de la cámara. Se repite hasta completar la extracción. Usualmente se emplean disolventes como el diclorometano, a veces combinados con acetona o hexano, excluyendo los no polares. Este método permite extraer compuestos volátiles y de alto peso molecular. Aunque reduce el uso de disolvente y asegura el contacto constante, no es idóneo para compuestos termolábiles debido a su posible degradación por la exposición prolongada al calor. Entre sus desventajas están la exposición a disolventes orgánicos peligrosos e inflamables, y el costo de disolventes de alta pureza (Abubakar & Haque, 2020; Fotsing et al., 2021; Kapadia et al., 2022).

1.1.5.3. Maceración

Es una de las técnicas más simples y antiguas de extracción, se lleva a cabo a temperatura ambiente. Consiste en sumergir materiales vegetales en disolventes polares como agua o alcoholes, polares intermedios como acetona o diclorometano y no polares como n-hexano, éter o cloroformo, durante un periodo prolongado. Esta prolongada inmersión rompe la pared celular, facilitando la transferencia de los compuestos activos al disolvente, que luego, se filtra para recuperar los compuestos bioactivos al presionar los residuos vegetales. La agitación en este proceso mejora la eficiencia de la extracción al fomentar la difusión y mantener un gradiente de concentración (Azmir et al., 2013; Dekebo, 2019; Farooq et al., 2022; Subramanian, P., & Anandharamakrishnan). La maceración es versátil para extraer diversos compuestos bioactivos, incluidos terpenoides, flavonoides, esteroides, polifenoles, taninos, alcaloides, cumarinas, antocianinas, enzimas oxidativas y degradativas, aminoácidos, lípidos, entre otros (Azwanida, 2015; Owuor, 2003). En un estudio de Lezoul et al. (2020), se demostró que la maceración fue adecuada para extraer flavonoides, siendo la acetona y etanol los disolventes más efectivos.

1.1.5.4. Métodos de extracción moderna

Los avances en el procesamiento de plantas medicinales son significativos, especialmente con métodos modernos y amigables con el ambiente para extraer sus componentes. Técnicas como la extracción con fluidos supercríticos (EFS), líquidos presurizados (ELP), microondas (EAM), ultrasonidos (EAU) y CO₂ supercrítico (scCO₂) ofrecen ventajas notables, como la reducción en el uso de disolventes orgánicos, tiempos de extracción más breves y rendimientos competitivos (**Azwanida, 2015; Kapadia et al., 2022; Zhang, Lin & Ye, 2018**).

1.1.6. Modelos animales en el estudio de la ansiedad

La investigación con modelos animales ha crecido desde el siglo XIX y es crucial para desarrollar fármacos, comprender enfermedades y explorar tratamientos alternativos debido a su similitud biológica con los humanos, reflejada en procesos biológicos, fisiológicos y genéticos compartidos (**Fernandes & Pedroso, 2017; Kabene & Baadel, 2019; Kiani et al., 2022; LaFollette, 2020; Pound & Bracken, 2014**). En neurociencias del comportamiento, estos modelos ayudan a entender cómo el cerebro afecta el comportamiento humano y a investigar trastornos psiquiátricos (**Bertoglio & Carobrez, 2016; Campos et al., 2013; Harro, 2018**). Los roedores, usados en estudios de ansiedad, muestran comportamientos similares a la ansiedad humana, aunque la experiencia no es idéntica. La ansiedad, tanto en humanos como en animales, tiene componentes innatos y desencadenados por situaciones o experiencias, evaluados mediante respuestas conductuales en entornos nuevos que generan un conflicto entre miedo y curiosidad (**Bertoglio & Carobrez, 2016; Campos et al., 2013**).

Los estudios relacionados con la ansiedad emplean una gama de modelos animales que incluyen peces cebra, primates y roedores. El pez cebra (*Danio rerio*) es esencial en la investigación de fármacos ansiolíticos, estrés y trastornos neuropsiquiátricos por su sensibilidad a cambios ambientales y fármacos. Ayuda a entender las vías moleculares de la ansiedad a la neurodegeneración, respaldado por avances en genética y detección de moléculas pequeñas para mejorar tratamientos (**Bencan, Sledge & Levin, 2009; Khan et al., 2017**). Los estudios de **Bencan, Sledge & Levin (2009)** y **Cachat et al. (2010)** que se centraron en el comportamiento del pez en relación con el buceo y la exploración, mostraron que fármacos como buspirona, clordiazepóxido y diazepam

tienen efectos ansiolíticos. También evidenciaron respuestas ansiogénicas durante la abstinencia a sustancias como etanol, diazepam, morfina y cafeína.

Los primates es otro tipo de animal empleado en la investigación de la ansiedad, sin embargo, su uso se ve limitado debido a consideraciones éticas y los altos costos asociados (Ausderau et al., 2023). En estudios con lémures de Trouche et al. (2010) y Languille et al. (2015), se encontraron diferencias en el comportamiento ansioso según la edad. Los lémures adultos jóvenes mostraron más errores en una tarea de memoria, especialmente con señales visuales, debido a la ansiedad por la novedad. En cambio, los lémures mayores cometieron menos errores en esa tarea, pero más en la memoria. Además, se apreció una reducción en la ansiedad por la novedad con la edad, demostrado por diferencias en la latencia al primer movimiento en pruebas como el campo abierto y laberinto claro-oscuro.

Por otro lado, los roedores, especialmente ratones y ratas, son comunes en estos estudios debido a su tamaño reducido, corta vida y facilidad de manejo (Steimer, 2011). Doukkali et al. (2015) evaluaron la actividad ansiolítica de *U. urens* en ratones adultos, mostrando resultados similares al diazepam en pruebas como el tablero de agujeros y caja clara/oscura, sugiriendo un perfil favorable a efectos secundarios. Mientras que, Mannan (2019) observó efectos ansiolíticos dosis-dependientes del extracto metanólico de *Bacopa monniera* en ratones, utilizando pruebas como caja clara/oscura, laberinto elevado, entierro de mármol y varilla giratoria con dosis de 50, 100 y 200 mg/kg. Además, Hawiset et al. (2022) investigaron el extracto de flor de *Azadirachta indica* en ratas estresadas, evidenciando mejoras en comportamientos ansiosos y depresivos con dosis de 500 mg/kg, junto con cambios en neurotransmisores y cortisol, sin provocar daño hepático en las ratas tratadas

1.1.6.1. Evaluación de la ansiedad en *Mus musculus*

Para medir la ansiedad en animales, se los expone a situaciones controladas que generan respuestas fisiológicas y de comportamiento. Existe alrededor de 30 métodos distintos, divididos en dos tipos: pruebas de respuesta incondicionada, que no requieren entrenamiento, y de respuesta condicionada, que implican aprendizaje y

pueden afectar la memoria y motivación (Steimer, 2011). Una de las pruebas más utilizadas es el laberinto elevado en cruz (EPM, por sus siglas en inglés), que utiliza brazos abiertos y cerrados para evaluar el tiempo que un ratón prefiere pasar en la seguridad de los brazos cerrados en contraste con los brazos abiertos y expuestos (Hylander, Repasky & Sexton, 2022).

El ratón (*Mus musculus*), son una opción común en los estudios sobre ansiedad, superando a otros modelos animales por sus similitudes anatómicas, celulares, moleculares y bioquímicas con los humanos. Estos animales comparten funciones cerebrales como la ansiedad, la memoria, el hambre, la agresión y otras respuestas emocionales, lo que los hace valiosos para investigar tanto el comportamiento humano en condiciones normales como patológicas. Además, son económicos, fáciles de criar y manejar, alcanzando la madurez en aproximadamente tres meses y viviendo alrededor de dos años. Presentan consistencia en el comportamiento y diversidad genética, lo que permite el estudio de diversos niveles de ansiedad en entornos controlados. La validez de estos modelos en replicar trastornos de ansiedad humanos ha sido demostrada en estudios. (Ronquillo et al., 2023; Sartori, Landgraf, & Singewald, 2011; Van Gaalen & Steckler, 2000; Van Meer & Raber, 2005).

Con frecuencia, se recurre a distintas cepas de ratones isogénicos para analizar comportamientos asociados con la ansiedad, como BALB/c (BALB), 129S6/SvEvTac (129S6) o C57BL/6J (B6) (Ronquillo et al., 2023). Los ratones BALB/c se caracterizan por su sensibilidad al estrés y la manifestación de conductas asociadas a la ansiedad. En comparación con otras cepas, muestran mayor ansiedad y menor sociabilidad. Asimismo, son más susceptibles al estrés social (Cryan & Holmes, 2005; Pilz et al., 2015). Estos ratones isogénicos presentan conductas agresivas, análogas a la ansiedad y a la depresión, lo que ha permitido su amplio uso en la investigación de estos aspectos de los trastornos psiquiátricos (Bryant et al., 2015). El estudio de Ronquillo et al. (2023), reveló un efecto ansiolítico más pronunciado en la cepa BALB en comparación con las cepas B6 y 129S6 inducidas al estrés, según las pruebas realizadas en laberinto elevado en cruz y campo abierto.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Determinar el efecto ansiolítico *in vivo* del extracto etanólico de ortiga macho (*Urtica leptophylla* Kunth) en ratones (*Mus musculus*).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar la concentración de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto etanólico.
- Analizar la capacidad ansiolítica del extracto etanólico *in vivo* mediante la técnica de puente de cruz elevada.
- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico en la especie animal mediante la técnica de DPPH.

CAPITULO II.- METODOLOGÍA

2.1.Materiales

2.1.1. Equipos de laboratorio

- Espectrofotómetro UV-Vis (Fisher Scientific-accuSkan Go)
- Plancha de agitación
- Rotaevaporador
- Balanza analítica
- Molino
- Deshidratador por convección
- Vortex (Labnet-varios huecos)
- Refrigerador
- Homogeneizador
- Centrifuga (para microtubos de 1.5 mL) (Centrífuga Eppendorf 5424R)
- Ultracongelador

2.1.2. Reactivos

- Etanol 70%
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio 10%
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Solución de carbonato de sodio 7%
- Solución de cloruro de aluminio 2% (p/v)
- Solución de quercetina
- Solución madre de DPPH
- Metanol
- Ácido Gálico
- Ácido ascórbico (C₆H₈O₆)
- Solución madre Trolox

- Tampón fosfato de sodio
- Solución salina
- Diazapem
- Tiopentanol sódico

2.1.3. Material fungible

- Paquete de papel Kraft
- Papel filtro
- Kit de ensayo de Bradford
- Papel aluminio
- Bisturí
- Paquete de guantes quirúrgicos
- Balón de aforo 100 mL
- Micropipeta (10 – 100 μ L, 20 – 200 μ L, 100 – 1000 μ L)
- Vaso de precipitación (100 mL, 250 mL, 500 mL)
- Probeta (10 mL, 50 mL, 100 mL)
- Frasco boeco
- Paquete de gasa
- Placa de pocillos
- Tubos eppendorf
- Paquete de fundas ziplock
- Placa de 96 pocillos
- Gradilla
- Embudo de vidrio
- Agitador de vidrio
- Paquete de hielo
- Tubos de ensayo 5 mL
- Paquete de fundas rojas
- Cronómetro
- Laberinto de cruz elevada
- Cámara de video

- Contenedor de agua
- Contenedor de alimento
- Jaulas para ratones
- Sonda
- Jaulas de inmovilización
- Equipo de disección

2.2. Métodos

2.2.1. Cuantificación de la concentración de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto etanólico

2.2.1.1. Recolección de ortiga macho (*Urtica leptophylla* Kunth)

La recolección se llevó a cabo en la parroquia Juan de Velasco (Pangor), ubicada en el cantón Colta de la provincia Chimborazo a 2889 m.s.n.m con coordenadas 1°48'59.5"S 78°52'54.7"W, posterior a la obtención de la autorización correspondiente del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE) (Anexo 1) para llevar a cabo la recolección de una muestra vegetal sin fines comerciales.

Una vez recolectada, la planta se trasladó al herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato para su identificación. Finalmente, la muestra se almacenó en la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

2.2.1.2. Preparación del material vegetal

La desinfección del material vegetal se llevó a cabo utilizando una solución diluida de hipoclorito de sodio (NaClO) al 10 %, seguida de un enjuague abundante con agua. Para secar el material vegetal, se empleó un deshidratador a una temperatura aproximada de 55°C durante un período de 24 horas. Una vez que el material se secó, se procedió a pulverizarlo mecánicamente con un molino hasta obtener un polvo fino

y se almacenó en fundas plásticas para evitar que se humedezcan (**Mariño Manzano, 2023**).

2.2.1.3. Preparación del extracto etanólico

Las hojas secas pulverizadas se mezclaron con etanol al 70 % en una proporción de 1:6 (p/v). Esta mezcla se dejó reposar en un lugar oscuro durante 4 días, con agitación ocasional, este proceso se llevó a cabo en dos ocasiones. Pasado este periodo, se procedió a filtrar usando un kitasato y una bomba de vacío. Posteriormente, se utilizó un evaporador rotatorio para eliminar el solvente. (**Mariño Manzano, 2023; Souza et al., 2018**).

Se calculó el rendimiento porcentual del extracto utilizando la fórmula descrita por **Mzid et al. (2020)**, la cual se menciona a continuación.

$$\%R = \frac{W_f}{W_i} * 100 \quad (1)$$

Donde, W_i es el peso inicial y W_f es el peso final después de obtener el extracto.

2.2.1.4. Cuantificación de fenoles

Se utilizó el método de Folin y Ciocalteu para evaluar el contenido fenólico. Se preparó una solución madre mezclando 10 mg del extracto etanólico en 1 mL de etanol. En una placa de microtitulación de 96 pocillos, se combinaron 10 μ L de muestra con 130 μ L de agua destilada y 10 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu (2 N). Después de 6 minutos, se añadieron 100 μ L de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7% (p/v). Las placas se incubaron en un entorno oscuro a temperatura ambiente durante 90 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a 750 nm para obtener los resultados. Además, se llevó a cabo una curva de calibración utilizando diluciones de 10 a 100 mg/L de ácido gálico (GAE). Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de peso seco de la muestra (mg GAE/g DW) (**Mariño Manzano, 2023**).

2.2.1.5. Cuantificación de flavonoides

Para determinar el contenido total de flavonoides, se utilizó un método colorimétrico que involucra el uso de cloruro de aluminio (AlCl_3). Se elaboró una solución madre combinando 10 mg de extracto en 1 mL de etanol. En las placas de 96 pocillos, se combinaron 60 μL de muestra con 120 μL de AlCl_3 al 2 % (p/v). Tras un periodo de incubación de una hora a temperatura ambiente, se procedió a medir la absorbancia de la muestra en una longitud de onda de 420 nm. Con el fin de establecer una referencia sólida, se generó una curva estándar utilizando una serie de concentraciones de quercetina que iban desde 10 hasta 100 mg/L. El contenido de flavonoides totales se expresó en miligramos de quercetina equivalente por gramo de peso seco de la muestra (mg QE/gDW) (Sancho Cando, 2023).

2.2.1.6. Actividad antioxidante del extracto etanólico

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante el ensayo de captación de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Para ello, se preparó una solución stock mezclando 10 mg de extracto con 1 mL de etanol (Mariño Manzano, 2023).

Posteriormente, se preparó una solución de DPPH con una concentración de 150 μM , utilizando una solución metanol-agua en proporción 80:20 (v/v) como diluyente (Mariño Manzano, 2023). Para la curva de calibración, se empleó una solución madre de Trolox con una concentración de 500 μM como estándar. Se realizaron diluciones en metanol-agua (50:50) para obtener concentraciones que variaron desde 50 hasta 500 μM (Bobo-García et al., 2015; Mariño Manzano, 2023; Rajurkar & Hande, 2011).

Se empleó una placa de microtitulación de 96 pocillos, donde se combinaron 20 μL del extracto diluido con 180 μL de la solución de DPPH. Como control, se obtuvo una mezcla de 180 μL de la solución de DPPH con 20 μL de agua destilada o etanol. Por otro lado, el blanco consistió en 180 μL de una solución metanol-agua (80:20) con 20

μL de agua destilada o etanol (Ayele et al., 2022; Bobo-García et al., 2015). Estas mezclas se protegieron de la luz y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 40 minutos. Posteriormente, se procedió a medir la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 515 nm (Mariño Manzano, 2023; Bobo-García et al., 2015).

El porcentaje de actividad secuestrante de radicales DPPH se calculó mediante la fórmula (Bobo-García et al., 2015):

$$\%Inhibición = \left[1 - \left(\frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

Donde A_c correspondió a la absorbancia de la solución control de DPPH, A_m fue la absorbancia de la solución de DPPH en presencia de la muestra (extracto) y A_b hizo referencia al blanco.

2.2.2. Análisis de la capacidad ansiolítica del extracto etanólico *in vivo* mediante la técnica de puente de cruz elevada

2.2.2.1. Modelo animal

Para el estudio, se utilizaron ratones albinos (Balb/c) macho adultos jóvenes, con edades de entre 2 a 3 meses de edad, y un peso entre 35 y 45 g. Estos animales fueron adquiridos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) (Riobamba, Ecuador). Durante el período experimental, se alojaron cinco animales por jaula, manteniendo condiciones ambientales estándar, que incluyeron una temperatura de 25 ± 2 °C, una humedad relativa entre 55 % y 65 % y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (Mannan, 2019).

La alimentación y el acceso al agua fueron proporcionados a través de contenedores, permitiendo que los animales accedieran a ellos según sus necesidades. Asimismo, los animales se aclimataron al equipo de prueba comportamental durante un periodo de tres días, dedicando al menos una hora diaria antes de iniciar el experimento (Doukkali et al., 2015; Hawiset et al., 2022).

Con el objetivo de realizar el estudio, los animales se dividieron en seis grupos, cada uno compuesto por cinco ratones. Se estableció un grupo de control y cinco grupos de estrés. Los animales del grupo de estrés se dividieron en un grupo positivo al cual se le administró clonazepam a una dosis de 1,5 mg/kg PC, un grupo control sin medicación y tres grupos experimentales tratados con *U. leptophylla* Kunth a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg de peso corporal (PC) (Doukkali et al., 2015).

De acuerdo con el enfoque de investigación de Hawiset et al. (2022), los medicamentos se administraron una vez al día por vía oral a través de una sonda entre las 9:00 y las 10:00 a.m., durante un período consecutivo de 30 días. Treinta minutos después de cada tratamiento, se sometió a los animales a una inmovilización durante 3 horas para inducir el estrés. La prueba comportamental se llevó a cabo en los días 1, 15 y 30 después de 30 minutos de estrés por inmovilización. Al concluir el experimento, se procedió al sacrificio de los animales mediante inyección intraperitoneal de tiopental sódico, utilizando una dosis de 40 mg/kg de PC.

2.2.2.2. Aprobación ética

El Comité de Bioética de Investigación de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (CBIESPOCH) aprobó este proyecto el 13 de octubre de 2023 (n.º de aprobación ESPOCH-CIBE-2023-0037) (Anexo 2).

2.2.2.3. Prueba de comportamiento

Se utilizó la prueba del laberinto en cruz elevada para evaluar el comportamiento. El laberinto estará compuesto por dos brazos cerrados (70 cm de largo × 10 cm de ancho × 40 cm de alto), dos brazos abiertos (70 cm de largo × 10 cm de ancho) y una plataforma central (10 cm × 10 cm). El laberinto estuvo elevado aproximadamente 50 cm por encima del suelo (Hawiset et al., 2022).

De acuerdo con la metodología descrita por Hawiset et al. (2022) y Cai et al. (2022), cada ratón fue colocado en la zona central frente a uno de los brazos abiertos y se le

permitió explorar libremente el laberinto durante 5 minutos, mientras una cámara de video registra su comportamiento. Durante este tiempo, se registraron las entradas (EA) y el tiempo (TA) de los ratones que ingresaron al brazo abierto, así como el número de entradas (EC) y el tiempo (TC) de los ratones que ingresaron en el área del brazo cerrado. Un incremento en la cantidad de veces que el ratón entró en los brazos abiertos y en la duración de su estancia en dichos brazos indicó que el ratón experimentó un nivel de ansiedad menor. Para considerar que el ratón ha ingresó al área del brazo abierto, se requirió que colocara las cuatro patas dentro de dicho brazo. Después de que cada ratón completó la exploración del laberinto, se procedió a limpiarlo con una solución de etanol al 70%.

Las fórmulas para determinar el porcentaje del número de entradas de brazo abiertas (3) y el porcentaje de duración de las entradas del brazo abierto (4) son las siguientes (Cai et al., 2022):

$$\%n_{entradas} = \frac{EA}{EA + EC} * 100\% \quad (3)$$

$$\%t_{entradas} = \frac{TA}{TA + TC} * 100\% \quad (4)$$

2.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico en la especie animal mediante la técnica de DPPH

2.2.3.1. Disección del hipocampo

Después de la prueba de comportamiento en el día 30, se procedió al sacrificio de los ratones y se recolectaron de manera inmediata los cerebros completos, los cuales fueron almacenados a una temperatura de -80 °C con el propósito de la disección del hipocampo y la realización de análisis neuroquímicos (Hawiset et al., 2022).

De acuerdo con la metodología descrita por **Jaszczyk, Stankiewicz & Juszcak (2022)**, la piel del cráneo del ratón fue removida y se realizó una incisión en la parte posterior de la cabeza para exponer el cráneo. Usando tijeras, se procedió a retirar el cráneo para revelar el cerebro. A continuación, el cerebro fue extraído del cráneo y colocado en una superficie de trabajo limpia o caja Petri. Mediante el uso de pinzas y bisturí, se identificó el hipocampo en el cerebro del ratón, ubicado en la región ventral del cerebro, entre el cuerpo calloso y el tálamo. Posteriormente, se aisló el hipocampo. Para finalizar, se limpió delicadamente el hipocampo aislado utilizando una solución salina balanceada con el fin de eliminar cualquier residuo o contaminante presente.

2.2.3.2. Preparación de la muestra

El hipocampo fue pesado y posteriormente homogeneizado en una solución tamponada con fosfato (PBS) (0,1M, pH 8) con una proporción 1:9 (peso del tejido en gramos: volumen de PBS en mililitros), utilizando un vortex. A continuación, la muestra fue centrifugada a $5000 \times g$ durante 5 min a $4^{\circ} C$, y se recolectó el sobrenadante (**Hawiset et al., 2022**).

2.2.3.3. Medición de la actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó conforme al procedimiento detallado en el ítem 2.2.1.6.

2.2.3.4. Cuantificación de proteínas totales

El contenido de proteínas de los sobrenadantes se estimó mediante el método de Bradford (**Andrade Cáceres & Murillo Mala 2019; Tong et al., 2021**). Siguiendo la metodología descrita por **Andrade Cáceres & Murillo Mala (2019)**, se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos. Inicialmente, se mezcló suavemente el reactivo Bradford en la botella y se dejó alcanzar la temperatura ambiente.

Se prepararon estándares de proteínas en un buffer, cubriendo un rango de concentraciones de 0,02 a 1,34 mg/mL. Estos estándares se obtuvieron utilizando un

estándar de seroalbúmina bovina (BSA). Se añadieron 5 µl de los estándares de proteínas a los pocillos de la placa de 96 pocillos. Para el blanco, se agregaron 5 µl de buffer en lugar de muestra de proteína. Además, se prepararon las muestras desconocidas con una concentración aproximada entre 0,02 y 1,34 mg/mL.

Posteriormente, se añadieron 250 µl del reactivo Bradford a cada pocillo utilizado y se mezcló en un agitador durante 30 segundos. Las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después de la incubación, se medirá la absorbancia a 595 nm. Se registró la absorbancia de las muestras antes de los 60 minutos y dentro de un intervalo de 10 minutos entre ellas.

Además, se estableció la curva de calibración utilizando una muestra de proteína de 5 µl con concentraciones que varían entre 0 a 25 mg/mL. A partir de estos estándares, se trazó una gráfica de la absorbancia neta en función de la concentración proteica de cada uno (Olson & Markwell, 2007).

2.2.3.5. Diseño experimental

Para el diseño experimental, se empleó el análisis de varianza (ANOVA), una herramienta estadística ampliamente utilizada para investigar las diferencias entre las medias de múltiples grupos y sus procedimientos relacionados, siendo su objetivo evaluar si hay diferencias significativas entre las medias de tres o más grupos (Banda et al., 2020).

En este contexto, se empleó un diseño completo al azar (DCA), donde, el factor de estudio o variable independiente será la concentración del extracto etanólico de *U. leptophylla* Kunth (a niveles de 100, 200 y 400 mg/kg de PC). La variable de respuesta o variable dependiente será el efecto ansiolítico, medido mediante un cambio colorimétrico (actividad antioxidante DPPH del cerebro del ratón), concentración proteica (Bradford del cerebro del ratón) y número de entrada y salidas del laberinto en cruz elevada (prueba comportamental en el ratón).

Cabe mencionar que se utilizaron ratones albinos (Balb/c) macho adultos jóvenes, con edades de entre 2 a 3 meses de edad, y un peso entre 35 y 45 g, los cuales se dividieron en seis grupos, cada uno compuesto por cinco ratones. Los grupos estudiados fueron:

- A. Grupo sin estrés y sin medicamentos.
- B. Grupo con estrés, pero sin medicamentos.
- C. Grupo con estrés y tratamiento con clonazepam.
- D. Grupo con estrés y administración de 100 mg de *U. leptophylla* Kunth por kg de PC.
- E. Grupo con estrés y administración de 200 mg de *U. leptophylla* Kunth por kg de PC.
- F. Grupo con estrés y administración de 400 mg de *U. leptophylla* Kunth por kg de PC.

Además de la aplicación del ANOVA, se complementó el análisis con dos pruebas post hoc, con valores de $p < 0,05$ considerados estadísticamente significativos.

- Prueba de Tukey, el cual comparó cada media con todas las demás en un análisis de comparaciones múltiples (Lee & Lee, 2018). Para esta prueba se aplicaron todos los grupos.
- Prueba de Dunnett, que contrastó cada media con una media de control específica (Lee & Lee, 2018). Se utilizó el grupo C como control positivo, mientras que, los contrastes se realizarán con los grupos A, B, D, E y F.

CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Rendimiento del extracto etanólico

El rendimiento de la extracción se ve influenciada por diversos elementos, incluyendo la modalidad de extracción utilizada, el tiempo y las condiciones bajo las cuales se realiza, así como también por la polaridad de los disolventes empleados (**Abubakar & Haque, 2020; Abdul Rahim et al., 2022**). El extracto etanólico de hojas de ortiga macho (*U. leptophylla* Kunth) obtenido mediante maceración logró un rendimiento del 6,15 %. Este resultado sobrepasó el rendimiento obtenido por **Mzid et al. (2018)**, que realizó maceración de *U. urens* utilizando etanol al 70 % durante 72 horas obteniendo un rendimiento de 4,768 %.

La reacción de la polaridad del disolvente se encuentra determinada por las características de la muestra, las propiedades químicas específicas del analito, y las interacciones que se presentan entre la matriz y el analito (**Dhanani et al., 2017**). En particular, la extracción con etanol es ampliamente aplicada en la industria cosmética, farmacéutica y de alimentos con el fin de obtener compuestos bioactivos de frutas, plantas y otros materiales naturales (**Stephane et al., 2021**). De acuerdo con **Zhang, Lin & Ye (2018)**, el etanol presenta una alta capacidad para disolver una amplia variedad de compuestos y extraer la mayoría de las moléculas presentes en la planta, incluyendo aquellas de naturaleza hidrófila o lipofílica. Además, el etanol conserva las proporciones químicas originales de la planta, siendo un aspecto crucial en la preservación de la calidad del extracto. Cabe mencionar que, según **Abdul Rahim et al. (2022)**, el rendimiento de la extracción aumenta con la polaridad del disolvente.

Al investigar diferentes disolventes en la extracción de *U. urens*, **Elsherif, Sulaiman & Milton (2023)**, encontraron que el etanol alcanzó un rendimiento notablemente alto del 17,40 %, en comparación con el uso de otros disolventes como agua (11,15 %), cloroformo (10,05 %) y éter de petróleo (6,40 %). Otros disolventes también han sido objeto de estudio. En una investigación con *U. dioica*, **Sharma et al. (2022)**

evidenciaron que el metanol logró un rendimiento del 8,05%, superando significativamente los valores de acetato de etilo (3,87%) y hexano (2,92%) en la extracción de compuestos. De igual forma, **Sidaoui et al. (2015)**, reportaron un rendimiento del 7,5 % utilizando etanol en la maceración de ortigas durante 24 horas.

Asimismo, el rendimiento de la extracción se ve directamente influenciada por la estabilidad al calor del material vegetal (**Abubakar & Haque, 2020**). En un estudio llevado a cabo por **Shabir et al. (2022)**, se utilizó la técnica Soxhlet para obtener un extracto etanólico de *U. dioica* con un rendimiento notable de 10,45 %, superando significativamente a los resultados obtenidos previamente por **Sidaoui et al. (2015)**, y en investigaciones anteriores sobre especies del género, como *U. urens* (**Mzid et al. 2018**) y (*U. leptophylla*). Según el estudio de **Gahlot, Bhatt & Joshi (2018)**, la extracción en caliente muestra una mayor eficacia en comparación a la extracción en frío, generando rendimientos significativamente mayores. Sin embargo, es crucial tener precaución con la exposición prolongada a altas temperaturas, ya que podría ocasionar la degradación térmica de compuestos sensibles al calor, como los compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos y flavonoides (**Alara, Abdurahman & Ukaegbu, 2021; Kapadia et al., 2022**). Por ende, se recomienda mantener la temperatura de ebullición del disolvente lo más baja posible para prevenir dicha degradación (**Abubakar & Haque, 2020**). Además, **Kostadinovic & Mitrev (2013)**, han indicado que temperaturas bajas (<40 °C) previenen la degradación de los polifenoles, lo que se traduce en mayores concentraciones de estos compuestos y una actividad antioxidante más elevada.

Se destaca la importancia de la agitación regular durante la maceración, ya que esta promueve la difusión y mantiene la solución concentrada separada de la superficie de la muestra mediante la adición de más solvente al material vegetal, lo que incrementa la eficacia de la extracción (**Srivastava et al., 2020**). Asimismo, la disminución del tamaño de las partículas mejora la interacción entre las muestras y los disolventes, aumentando la eficiencia y rendimiento en el proceso de extracción. La trituración produce partículas más pequeñas y uniformes, optimizando así el contacto con los disolventes. (**Fotsing et al., 2021**).

3.1.2. Determinación de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante del extracto etanólico

Los metabolitos, elementos intermedios en la naturaleza, constituyen moléculas de tamaño reducido y se clasifican en dos grupos fundamentales: los metabolitos primarios y los metabolitos secundarios (**Fotsing et al., 2021**). Los metabolitos primarios desempeñan un papel crucial en procesos vitales como el crecimiento, el desarrollo y la reproducción (**Abdel-Aziz, Abo Elsoud & Anise, 2017**). Dentro de esta categoría, se encuentran elementos celulares esenciales, tales como aminoácidos, azúcares, proteínas, carbohidratos, polisacáridos y lípidos, además de compuestos generados por fermentación, como ácido acético, ácido láctico, etanol y ácido cítrico (**Abdel-Aziz, Abo Elsoud & Anise, 2017; Fotsing et al., 2021**).

Por otro lado, los metabolitos secundarios, aunque no vitales para la supervivencia de las plantas, desempeñan un papel esencial en su funcionamiento y tienen un impacto significativo en el entorno, además de poseer propiedades medicinales que son beneficiosas para la salud humana (**Fotsing et al., 2021; Lal et al., 2023**). Entre estos metabolitos, los fenoles y flavonoides influyen en el color, el aroma y las propiedades farmacológicas de las plantas. Existen más de 8.000 compuestos fenólicos que se encuentran de forma natural en las plantas, siendo los flavonoides el grupo más amplio dentro de estos. Estos compuestos, se identifican como los principales fitoquímicos presentes en las plantas conocidos por su destacada capacidad antioxidante (**Tungmannithum et al., 2018**).

Estos compuestos fitoquímicos han demostrado tener aplicaciones significativas en los campos de la farmacología y la medicina debido a su notable efecto antioxidante y diversas capacidades, que incluyen propiedades anticancerígenas, antibacterianas, cardioprotectoras, antiinflamatorias y su potencial para fortalecer el sistema inmunológico, así como su capacidad para proteger la piel contra la radiación ultravioleta (**Tungmannithum et al., 2018**). Además, se ha observado la posibilidad de que, gracias a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, puedan ser eficaces en el tratamiento de la depresión y la ansiedad (**Jia et al., 2023**).

Los componentes primordiales presentes en las hojas de ortiga incluyen compuestos polifenólicos, tales como flavonoides y ácidos fenólicos (Flórez, Cazón & Vázquez, 2022). En consecuencia, se procedió a evaluar el contenido total de fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico de *U. leptophylla* Kunth, y los resultados obtenidos se exponen de manera detallada en la Tabla 1.

Tabla 1.

Cuantificación de contenido de fenoles totales y flavonoides totales de Urtica leptophylla Kunth.

Flavonoides totales (mg EQ/g PS)	Fenoles totales (mg EAG/g PS)
12,27 ± 1,14	15,43 ± 0,90

Nota. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (DE) de seis determinaciones independientes. PS: Peso Seco; EQ: Equivalente de Quercetina; EAG: Equivalente de Ácido Gálico.

La concentración de fenoles totales se estableció en 15,43 ± 0,90 mg EAG/g PS, mostrando una significativa superioridad con respecto al estudio de **Elsherif, Sulaiman & Milton (2023)**, realizado en una planta del mismo género, pero de diferente especie (*U. urens*), que registró un valor de 8,96 ± 0,63 mg EAG/g PS. Sin embargo, este resultado fue significativamente inferior al informado por **Mzid et al. (2018)** en *U. Urens*, con un valor de 31.41 ± 0.31 mg EAG/g PS, y al reportado por **Shabir et al. (2022)**, para *U. dioica*, con 42,16 ± 2,06 mg EAG/g PS.

Por otro lado, la concentración de flavonoides para este estudio fue de 12,27 ± 1,14 mg EQ/g PS (Tabla 1), cifra comparable al registro de **Shabir et al., (2022)**, en *U. dioica*, con una concentración de 12,48 ± 1,04 mg EQ/g PS, pero significativamente mayor a los valores registrados en los estudios mencionados previamente para fenoles, con valores de 6,81 ± 1.72 mg EQ/g PS en *U. Urens* (**Mzid et al., 2018**) y 2,08 ± 0,09 mg EQ/g PS para *U. Urens* (**Elsherif, Sulaiman & Milton, 2023**).

No obstante, los niveles tanto de fenoles como de flavonoides obtenidos en la presente investigación fueron significativamente inferiores a los reportados por **Khalid, Jabeen & Javaid (2023)**, en el extracto metanólico de *Neurada procumbens* Linn, reconocida por su potencial ansiolítico y antidepresivo. En dicha investigación, se registraron concentraciones de $78,8 \pm 2$ mg EAG/g PS y $63,5 \pm 1,6$ mg EQ/g PS, para fenoles y flavonoides, respectivamente. Asimismo, en otro extracto metanólico de una planta con propiedades ansiolíticas, *Canarium resiniferum*, se documentaron valores de $90,94 \pm 0,75$ EAG/g PS para la concentración de fenoles y $51,54 \pm 0,78$ 6 mg EQ/g PS para flavonoides (**Shah et al., 2022**). Sin embargo, en el estudio de **Arcos-Martínez et al. (2016)**, en el extracto etanólico de *Argemone mexicana*, planta que ha demostrado sus posibles propiedades ansiolíticas, la concentración de fenoles fue inferior a la obtenida en esta investigación, con un valor de $12,31 \pm 1,20$ EAG/g PS, aunque presentó un valor superior en cuanto al contenido de flavonoides totales, con una concentración de $190,90 \pm 26,70$ mg EQ/g PS.

La composición fenólica de las plantas se ve afectada por una variedad de factores, entre los cuales incluyen el genotipo, variedad, características del suelo, momento de la cosecha, etapa vegetativa de la planta, condiciones climáticas, procesamiento, prácticas de almacenamiento y tratamientos aplicados (**Kregiel, Pawlikowska & Antolak, 2018**). Además, **Di Virgilio et al. (2015)**, destacan que la selección del momento de recolección de las ortigas en diversas estaciones del año también está condicionada por el propósito específico que se busca alcanzar, ya sea la obtención de forraje, la producción de medicamentos, la extracción de clorofila, la obtención de fibra o simplemente la recolección de hojas.

Se ha evidenciado que las hojas de ortiga tienen niveles más altos de polifenoles individuales en comparación con otras plantas silvestres (**Augspole et al., 2017**). En un estudio de **Vajić et al. (2015)**, se identificó que la rutina es el compuesto fenólico predominante en las hojas de ortiga. Además, **Orčić et al. (2014)**, destacaron que los perfiles de polifenoles en *U. dioica* variaban según las partes de la planta y el lugar de adquisición. Es importante destacar que la composición de las raíces de ortiga es cualitativa y cuantitativamente diferente en comparación con las partes aéreas de la

planta, presentando un contenido significativamente menor de la mayoría de los fenoles (Pinelli et al., 2008; Orčić et al., 2014). La variabilidad de estos factores podría tener un impacto significativo en la composición fenólica de las ortigas y, en consecuencia, en su utilidad y posibles aplicaciones en diversos ámbitos.

Tabla 2.

Capacidad antioxidante de Urtica leptophylla Kunth.

Actividad antioxidante	
% AA	μmol ET/L
62,28 ± 0,94	332,25 ± 5,82

Nota. Los valores se expresan como media ± DE de seis determinaciones independientes. ET: Equivalente de Trolox. % AA: Porcentaje de Actividad Antioxidante

El porcentaje de eliminación de radicales del DPPH en este estudio fue de 62,28 ± 0,94 % con una concentración igual a 332,25 ± 5,82 μmol ET/L, inferior al registrado por Mzid et al. (2018) en el extracto etanólico de *U. Urens*, con un valor de 245,65 ± 10,2 μg ET/mL, lo que equivale a 981 ± 10,2 μmol ET/L y al extracto acuoso de *U. Urens*, con un valor de 142,94 ± 10,54 μg ET/mL, equivalente a 571 ± 10,54 μmol ET/L, lo que conlleva a un porcentaje de inhibición del radical libre de DPPH de 93,56 y 64,56 %, respectivamente. Sin embargo, el valor de esta investigación fue superior a el extracto etanólico de diferentes variedades de especies de lavanda, específicamente *Lavandula angustifolia* y *Lavandula x intermedia*, planta conocida por su efecto sobre la ansiedad, presentando valores entre 156.75 a 206.77 μmol Trolox/L y 151,92 a 157,98 μmol Trolox/L, respectivamente (Dobros, Zawada & Paradowska, 2022).

3.1.3. Efecto de *U. leptophylla* Kunth sobre actividad ansiolítica

La repercusión del estrés en el bienestar cotidiano de las personas se evidencia en la prolongación de este estado, generando desequilibrios en sistemas fundamentales como el gastrointestinal, neurohormonal, inmunológico, cardiovascular y nervioso. Además, existe una relación entre el estrés y el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas, tales como la depresión y la ansiedad (**Hassoulas, 2021; Mah, Szabuniewicz & Fiocco, 2016; Mcewen, 2004**).

Conforme a las investigaciones de **Joo et al. (2009)**, se observó que la inmovilización de ratones ICR durante 2 horas diarias a lo largo de 15 días consecutivos indujo comportamientos ansiosos en dichos roedores. Asimismo, **Hawiset et al. (2022)** informaron sobre la manifestación de conductas ansiosas en ratas Wistar sometidas a inmovilización durante 3 horas al día durante 15 días. En un estudio llevado a cabo por **Reyhanditya et al. (2022)**, con ratones BALB/c, se evidenció un comportamiento ansiolítico resultante del estrés de inmovilización durante 2 horas al día durante 14 días. Estos resultados concuerdan con la presente investigación, que demostró que el estrés provocado por la inmovilización diaria durante 3 horas a lo largo de 30 días puede inducir comportamientos semejantes a la ansiedad en ratones.

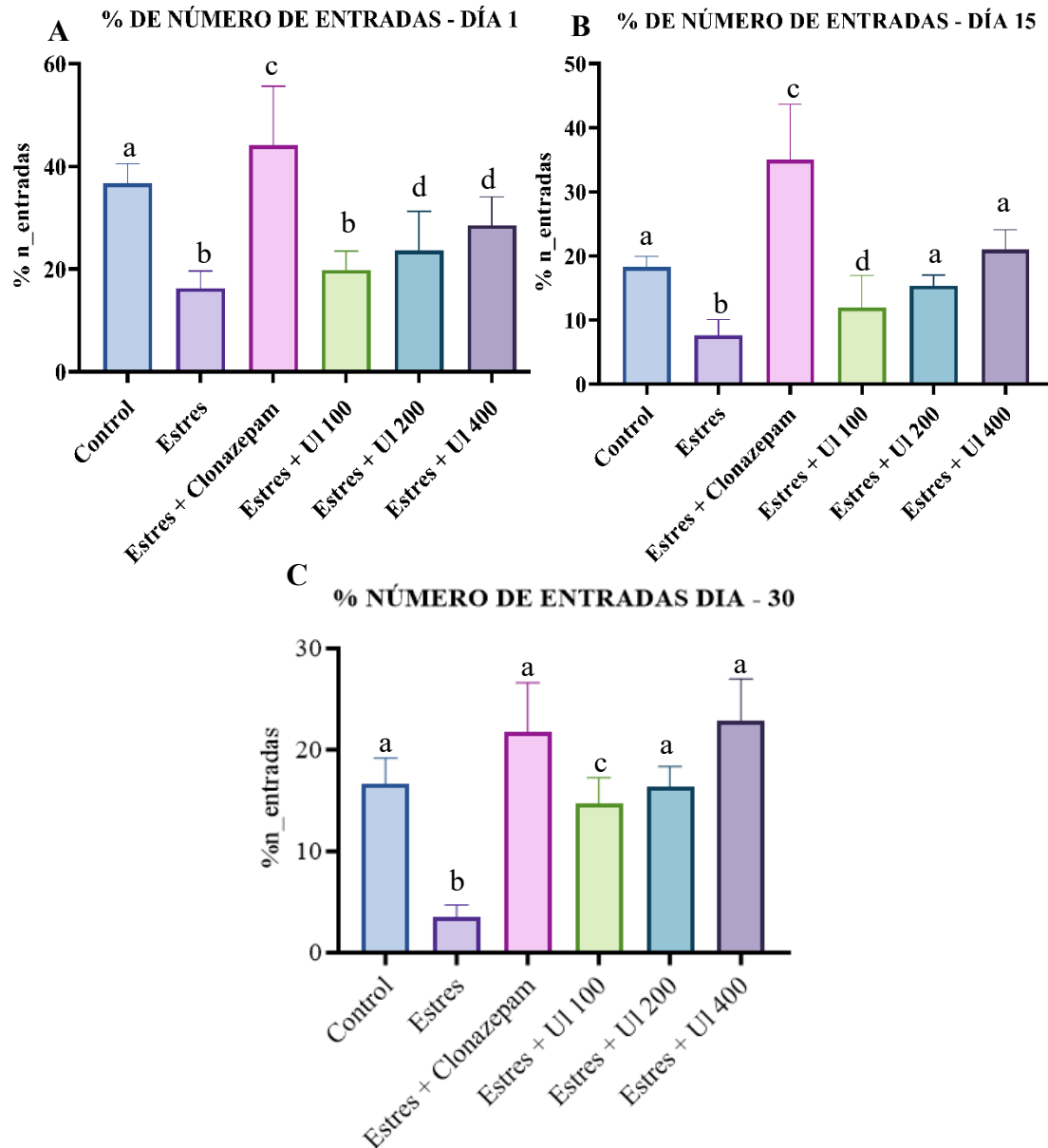
La prueba de laberinto elevado en cruz (LCE) se destaca como uno de los métodos más frecuentemente usado para evaluar el comportamiento vinculado a la ansiedad. Este procedimiento implica la utilización de brazos abiertos y cerrados con el objetivo de medir la preferencia de un roedor por pasar tiempo en la seguridad de los brazos cerrados en comparación con los brazos abiertos. Basándose en la tendencia natural de los roedores a buscar refugio en ambientes oscuros y cerrados (atracción), así como en su instintivo temor a las alturas y áreas abiertas (evitación) (**Hylander, Repasky & Sexton, 2022; Walf & Frye, 2007**). Según **Walf & Frye (2007)**, más allá de su aplicabilidad para detectar los efectos ansiolíticos de compuestos afines a las benzodiazepinas, el PLC se erige como un ensayo conductual idóneo para explorar las áreas cerebrales y los mecanismos subyacentes al comportamiento ansioso.

Las BZD son útiles en el tratamiento de los trastornos de ansiedad debido a su rápido inicio de acción y buena tolerancia. Sin embargo, por sus efectos adversos como la tendencia adictiva, su uso se limita a períodos cortos. El clonazepam, perteneciente a

este grupo, se destaca por requerir dosis bajas y exhibir un perfil de efectos secundarios más favorable en comparación con otros medicamentos similares, como el lorazepam o el alprazolam (Edinoff et al., 2021; Wang et al., 2016).

Figura 1.

Porcentaje del número de entradas de Mus musculus a brazos abiertos.

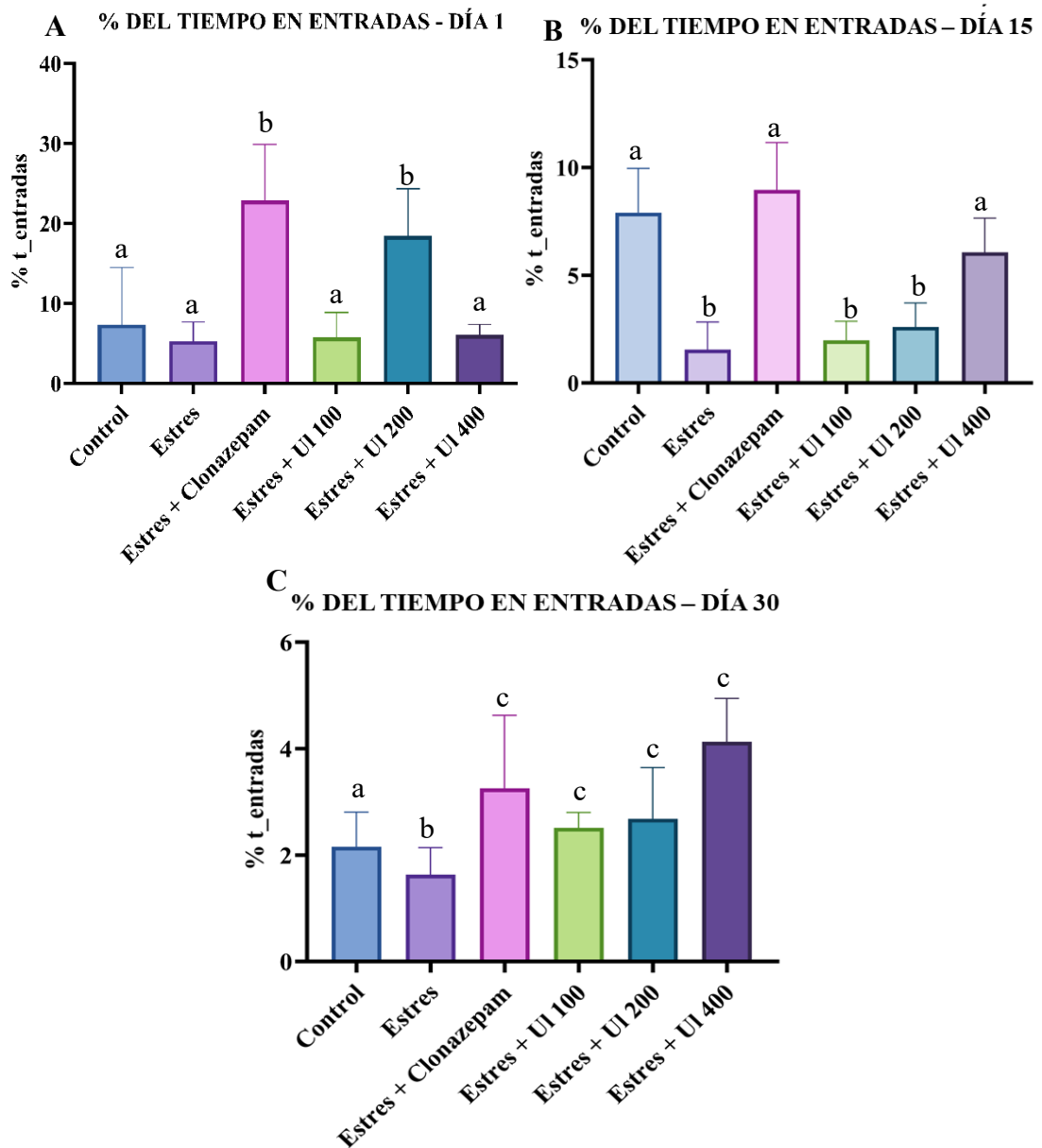


Nota. Efectos del extracto etanólico (100, 200, 400 mg/kg PC), clonazepam (1,5 mg/kg PC), grupo solo estrés y grupo control sobre el número de entradas a brazos abiertos en la prueba LCE en los días: 1 (A), 15 (B) y 30 (C). Los valores se presentan como

medias \pm DE. Los conjuntos de datos se analizaron mediante ANOVA DCA seguido de pruebas Pos hoc Tukey y Dunnett.

Figura 2.

Porcentaje del tiempo en entradas de Mus musculus a brazos abiertos.



Nota. Efectos del extracto etanólico (100, 200, 400 mg/kg PC), clonazepam (1,5 mg/kg PC), grupo solo estrés y grupo control sobre el tiempo en entradas a brazos abiertos en la prueba LCE en los días: 1 (A), 15 (B) y 30 (C). Los valores se presentan como medias \pm DE. Los conjuntos de datos se analizaron mediante ANOVA DCA seguido de pruebas Pos hoc Tukey y Dunnett.

Los efectos de *U. leptophylla* sobre el tiempo de permanencia y el número de entradas en los brazos abiertos en la prueba LCE se ilustran en **Figura 1 y 2**. La administración del extracto etanólico de *U. leptophylla* (100, 200 y 400 mg/kg PC) mostró actividad ansiolítica al aumentar tanto el tiempo empleado como el número de entradas en los brazos abiertos de forma dosis-dependiente. El tiempo empleado y el número de entradas en los brazos abiertos aumentaron significativamente en el grupo tratado con 400 mg/kg PC. A 200 mg/kg, *U. leptophylla* mostró un efecto ansiolítico moderado, pero no significativo frente al grupo tratado con clonazepam 1,5 mg/kg PC tanto en el tiempo empleado como el número de entradas en los brazos abiertos, de igual forma, no hubo una diferencia significativa en los grupos con administración de 100 y 400 mg/kg PC ($P > 0,05$), a comparación del grupo de solo estrés (control negativo) que mostró una diferencia significativa frente al control positivo tanto en el tiempo ($1,98 \pm 0,13$; $P < 0,05$) como en el número de entradas ($3,83 \pm 1,40$; $P < 0,05$). Como se esperaba, clonazepam a 1,5 mg/kg (control positivo) aumentó significativamente el tiempo transcurrido ($3,96 \pm 1,27$ %; $P < 0,5$ frente al grupo de control) y el número de entradas ($22,18 \pm 0,82$; $P < 0,5$) en los brazos abiertos.

Según el estudio llevado a cabo por **Doukkali et al. (2016a)**, se evidenció que el extracto acuoso de *U. urens*, mostró efectos ansiolíticos prometedores a una dosis de 400 mg/kg de PC. Este hallazgo se sustenta en la evaluación de LCE, donde se observó un aumento significativo en el tiempo de permanencia y el porcentaje de entradas en los brazos abiertos de los ratones Balb/c. Así mismo, de acuerdo con la investigación de **Patel et al. (2018)**, se observó que el extracto metanol-agua de *U. dioica*, administrado a una dosis de 50 mg/kg de PC, alivió el comportamiento asociado a la ansiedad en ratones albinos suizos machos inducidos a diabetes por estreptozotocina. Por otro lado, el estudio de **Shah et al. (2022)** con el extracto metanólico de *Canarium resiniferum*, reveló que dosis en el rango de 200 a 400 mg/kg de PC mostraron una actividad ansiolítica significativa. Este efecto se manifestó en un aumento tanto en el tiempo pasado como en el número de entradas de los ratones albinos suizos tratados en los brazos abiertos, siendo comparable a los resultados obtenidos con diazepam (1 mg/kg).

Un extracto que funciona en dosis bajas puede implicar que es más potente o eficaz, además, la relación entre potencia e índice terapéutico ayuda a comprender los posibles beneficios y riesgos de un fármaco. Una potencia más alta puede mejorar potencialmente el índice terapéutico, lo que conduciría a tratamientos más eficaces con menos efectos secundarios (Currie, 2018; Daley-Yates, 2015).

De acuerdo a Fedetova et al. (2017), los flavonoides y fenoles exhiben propiedades ansiolíticas, las cuales se atribuyen a su marcada afinidad por el sitio de unión de las BZD en los receptores GABA-A. La interacción de las BZD con los receptores GABA-A potencia la apertura del canal de cloruro asociado, provocando la hiperpolarización de la membrana neuronal y, como resultado, manifestando actividad ansiolítica (Shah et al., 2022). Entre los principales componentes de las hojas de ortiga se encuentran los compuestos polifenólicos, como los ácidos fenólicos (ácidos siríngico, cafeico, ferúlico, gálico) y los flavonoides, dentro del cual entre los abundantes se encuentra la quercetina y la rutina (Flórez, Cazón & Vázquez, 2022; Kregiel, Pawlikowska & Antolak, 2018).

Con base en la investigación realizada por Islam et al. (2022), se observó que la quercetina, administrada a una dosis de 50 mg/kg de PC en ratones albinos suizos, ejerció un efecto ansiolítico, posiblemente a través de la vía de interacción del receptor GABA asociada a la unión de las BZD. Asimismo, el estudio de Anesti et al. (2020), demostró que la rutina, administrada a una dosis de 100 mg/kg de PC en ratones macho Balb-c, exhibió actividad ansiolítica, respaldada mediante el uso de LCE, que reveló un aumento en la exploración y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Aunque la actividad ansiolítica de la rutina se atribuye a los receptores GABA, esta puede no estar asociada con el sitio de unión de las BZD (Anesti et al., 2020; Hernandez-Leon, González-Trujano & Fernández-Guasti, 2017). Por otro lado, la investigación llevada a cabo por Mansouri et al. (2014), el ácido gálico actúa como agente ansiolítico en dosis comprendidas entre 30 y 300 mg/kg de PC, validado mediante LCE. No obstante, esta actividad ansiolítica podría estar principalmente mediada por los receptores 5-HT.

3.1.4. Efecto de *U. leptophylla* Kunth sobre los radicales libres del hipocampo

El estrés oxidativo (EO) se caracteriza por la prevalencia de sustancias químicas que promueven este estado como los prooxidantes, en comparación con los antioxidantes que ayudan a su inhibición. La presencia de concentraciones elevadas de oxidantes en el entorno celular conlleva a un daño significativo en los componentes celulares, generando malestar disfunción celular, fisiológico grave e incluso muerte celular (Lichtenberg & Pinchuk, 2015). El EO se ha vinculado con la etiología de diversas patologías, abarcando trastornos neurológicos y psiquiátricos, como la ansiedad (Hovatta, Juhila, & Donner, 2010).

A pesar de que el cerebro constituye tan solo el 2% del peso total del cuerpo, su demanda de oxígeno asciende aproximadamente al 20% (Fedoce et al., 2018). A pesar de esta marcada dependencia del oxígeno, el SNC exhibe una vulnerabilidad significativa al EO, atribuible a factores tales como la propensa autooxidación de neurotransmisores, las características metabólicas y estructurales distintivas de las neuronas, la capacidad limitada de regeneración de las células neurales, la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas neuronales, y la capacidad de la microglía cerebral para generar cantidades sustanciales de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno cuando se activa de manera inapropiada. Adicionalmente, las defensas antioxidantes en el SNC se encuentran relativamente atenuadas en comparación con otros tejidos, manifestándose en niveles bajos de enzimas como el glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) (Choi et al., 2005; Günther et al., 2018; Fedoce et al., 2018; Friedman, 2011).

La generación de ROS, como el superóxido (O_2^-), en las mitocondrias tiene el potencial de inducir el estrés oxidativo. En las mitocondrias normales, el oxígeno se reduce a agua a través del complejo citocromo c oxidasa (Complejo IV) en cuatro pasos consecutivos de un electrón. Aunque la liberación de intermediarios de oxígeno parcialmente reducidos no ocurre durante este proceso debido a la alta afinidad de unión del citocromo c, entre el 1% y el 2% del oxígeno molecular consumido se convierte en O_2^- debido a una fuga de electrones en otros sitios de la cadena de

transporte de electrones mitocondrial. El O_2^- también puede originarse a partir de diversas fuentes celulares (**Fedoce et al., 2018; Kalogeris, Bao & Korthuis, 2014**).

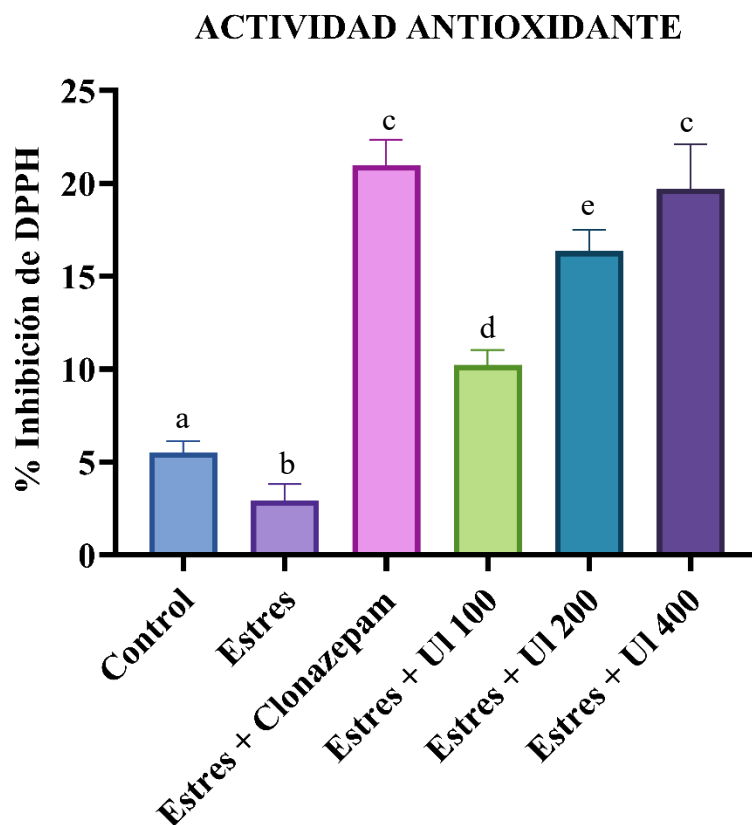
El superóxido dismutasa intracelular (SOD) convierte el O_2^- a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 puede eliminarse mediante GPx en las mitocondrias o, en el citosol, mediante antioxidantes como la CAT y las peroxiredoxinas (Prx). En situaciones de generación aumentada de O_2^- o agotamiento de sistemas antioxidantes, el H_2O_2 puede acumularse, llevando a un estado de estrés oxidativo mitocondrial. En este estado, el H_2O_2 puede reaccionar con metales de transición como el Fe^{2+} mitocondrial, generando el radical hidroxilo ($HO\cdot$), causando daño a estructuras celulares y provocando alteraciones cognitivas y conductuales observadas en trastornos psiquiátricos (**Fedoce et al., 2018; Flynn & Melov, 2013; Kalogeris, Bao & Korthuis, 2014**).

Los antioxidantes, derivados tanto de fuentes internas en el organismo como externas de origen vegetal, son vitales para defender al cuerpo del daño causado por ROS generadas naturalmente en procesos fisiológicos. Su función es neutralizar los radicales libres, contrarrestando el estrés oxidativo (**Ahmadi, Abdolmaleki & Jebeli Javan, 2023; Fedoce et al., 2018**). En el hipocampo hay diversos antioxidantes como tanto enzimáticos como no enzimáticos, tales como CAT, glutatión, SOD, GPx, entre otros (**Lee, Cha & Lee, 2020; Mironczuk-Chodakowska, Witkowska & Zujko, 2018**). Por otro lado, los fenoles como flavonoides actúan como compuestos antioxidantes, y pueden llegar al cerebro como el hipocampo, atravesando la barrera hematoencefálica (**Carecho, Carregosa, & Dos Santos, 2021**).

El radical lipófilo estable DPPH se emplea como modelo para la evaluación de la actividad antioxidante en diversas muestras biológicas, incluyendo el tejido cerebral (**Ajarem et al., 2015; Chedea & Pop, 2019**). De acuerdo con **Katerji, Filippova, & Duerksen-Hughes (2019)**, por lo general, la investigación del estado antioxidante se centraba típicamente en la medición individual de los niveles o actividades de cada antioxidante de manera individual. Sin embargo, la valoración del efecto general de los antioxidantes, como se realiza en el ensayo de reducción de DPPH, emerge como un enfoque valioso para analizar el estado oxidativo en muestras biológicas, considerando la diversidad de interacciones entre los diferentes antioxidantes.

Figura 3.

Actividad antioxidante del hipocampo del ratón en el ensayo de eliminación de radicales libres de DPPH.



Nota. Dosis de administración de los tratamientos con *U. leptophylla* (UI), UI 100: 100 mg/kg PC; UI 200: 200 mg/kg PC; UI 300: dosis de 100 mg/kg PC. Los valores se expresan como media \pm DE de cinco determinaciones independientes

Cómo se puede observar en la **Figura 3**, los efectos de *U. leptophylla* en relación al porcentaje de actividad antioxidante. La administración del extracto etanólico de *U. leptophylla* (100, 200 y 400 mg/kg PC) mostró una notable potencia en la regeneración y estimulación en la neuroprotección contra el estrés oxidativo. A una dosis 400 mg/kg PC no se presentó diferencia significativa frente al control positivo (grupo tratado con clonazepam a 1,5 mg/kg) ($19,73 \pm 1,82$ %) ($P > 0,05$). Mientras que a una dosis de 100 y ,200 mg/kg PC, presento una diferencia significativa frente al grupo control positivo ($P < 0,05$), sin embargo, todas las dosis de administración presentaron una diferencia

significativa en el aumento del porcentaje de actividad antioxidante en contraste al control y al grupo que solo se generó estrés (control negativo). De acuerdo a varios estudios la generación de estrés por inmovilización leve, agudo y crónico provoca el aumento de ROS conllevando el daño cerebral por los niveles bajos de antioxidantes, muerte neuronal y daño tisular (**Khalifa et al., 2023; Lee et al., 2006; Marzatico et al., 1998; Samarghandian et al., 2017**).

De acuerdo con el estudio realizado por **Toldy et al. (2009)**, se evidencio que la comida de ratas Wistar suplementada con hojas de *U. dioica* triturada, redujo los niveles de radicales libres en el tejido cerebral. De igual forma, de acuerdo con **Bisht et al. (2017)**, el extracto hidroalcohólico de *U. dioica*, en una dosis de 80 mg/kg, se observó que se restableció el agotamiento de la dopamina y potencio el efecto neuroprotector cuando se administró con minociclina, de igual forma, disminuyo las citocinas proinflamatorias, restableciendo los niveles de glutatión y catalasa en el tejido cerebral de ratas Wistar macho inducidas a la enfermedad de Parkinson. Por otro lado, en el estudio del extracto hidroalcohólico de la misma especie vegetal en ratones albinos suizos de **Ozen & Korkmaz (2003)**, se evidencia que el extracto a dosis de 50 y 100 mg/kg de PC tiene un efecto eficaz en inducir la actividad de enzimas antioxidantes.

3.1.5. Efecto de *U. leptophylla* Kunth sobre los niveles de proteínas del hipocampo

Concentraciones elevadas de oxidantes pueden causar daño a componentes celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (**Tabak et al., 2011**). Los fosfolípidos, tanto las proteínas solubles como las unidas a membrana, y el ADN nuclear y mitocondrial, se dañan fácilmente por la oxidación, lo que puede provocar un mal funcionamiento celular, disfunción tisular e incluso insuficiencia orgánica (**Fedoce et al., 2018**).

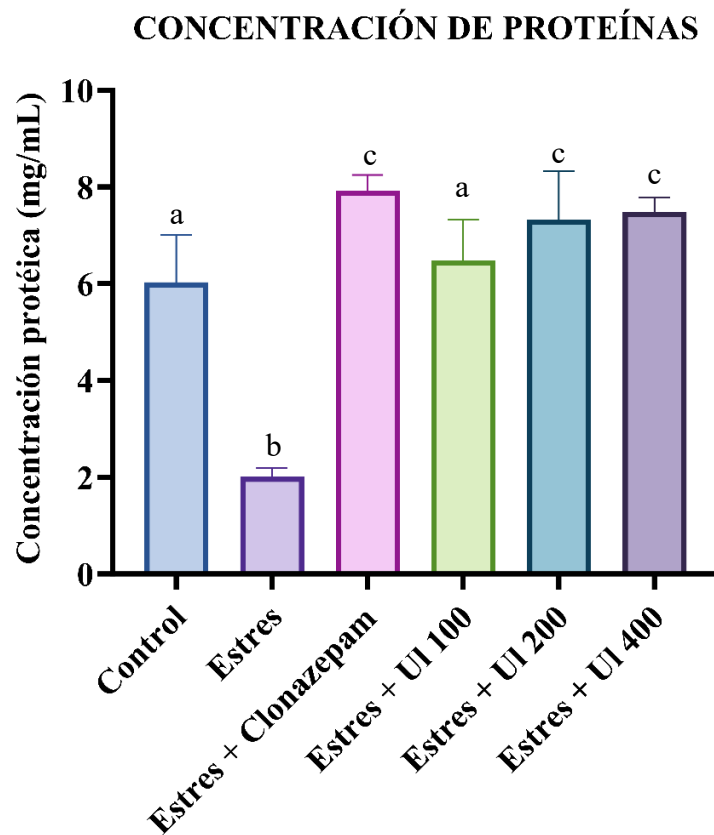
La inhibición de la proteasoma puede estar implicada en la neurotoxicidad asociada con el estrés oxidativo. La proteasoma, como enzima proteolítica principal, desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis de las proteínas (proteostasis) en el núcleo, retículo endoplásmico y citoplasma celular, además, es relevante en el

procesamiento de proteínas dañadas por oxidación (Fedoce et al., 2018; Raynes, Pomatto & Davies, 2016).

La neuroinflamación es crucial en la patogénesis de trastornos neurológicos, como la ansiedad, la depresión y las enfermedades neurodegenerativas (Skaper, Facci & Giusti, 2014). Las microglías, en calidad de macrófagos y células inmunitarias claves en el SNC, son fundamentales para iniciar y regular la neuroinflamación (Lynch, 2009). La activación anormal de la microglía puede dar lugar al aumento de moléculas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α , la interleucina-1 β y el factor nuclear Kappa B (NF- κ B). Esta liberación de citocinas proinflamatorias, a su vez, se asocia con el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos como la depresión y el trastorno de ansiedad (Fedoce et al., 2018).

Figura 4.

Cuantificación proteica del hipocampo del ratón en el ensayo por Bradford.



Nota. Dosis de administración de los tratamientos con *U. leptophylla* (UI), UI 100: 100 mg/kg PC; UI 200: 200 mg/kg PC; UI 300: dosis de 100 mg/kg PC. Los valores se expresan como media \pm DE de cinco determinaciones independientes

Cómo se puede observar en la **Figura 4**, los efectos de *U. leptophylla* en relación a la concentración proteica en el hipocampo del cerebro. A dosis de 200 y 400 mg/kg PC no se presentaron diferencia significativa frente al control positivo (grupo tratado con clonazepam a 1,5 mg/kg) ($P > 0,05$), lo que sugiere que puede prevenir la degradación de proteínas causada por el estrés oxidativo. De igual forma, el grupo tratado con 100 mg/kg PC de *U. leptophylla* a pesar de mostrar diferencia significativa frente al grupo tratado con clonazepam, no muestra diferencia significativa frente al control ($P > 0,05$). A comparación del control negativo que presento una diferencia significativa frente al control positivo ($2,01 \pm 0,16$ mg/ml) ($P < 0,05$).

De acuerdo con el estudio llevado a cabo por **Toldy et al. (2009)**, la combinación de ejercicio regular y la suplementación con *U. dioica* se asocia con una reducción en la transcripción de proteínas inflamatorias, sugiriendo posibles implicaciones en la apoptosis. Las conclusiones de **Keshvari et al. (2020)**, indica que el extracto hidroalcohólico de *U. dioica*, disminuye la desorganización neuronal, junto con un aumento en la densidad microglial y el grosor de la capa molecular piramidal en el hipocampo. Estos efectos se atribuyen a un aumento de la proteína GAP-43, vinculada a procesos de plasticidad, regeneración nerviosa y procesos de aprendizaje-memoria, además, se observó la disminución de la proteína CAP-1, esencial en el desarrollo neuronal, sin embargo, su sobreexpresión puede conllevar daños en el cerebro.

En otro estudio realizado por **Rahmati et al. (2021)**, se destaca el potencial del extracto hidroalcohólico de *U. dioica* para reducir la neuroinflamación en el hipocampo, evidenciado por la disminución de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β en ratas Wistar con diabetes inducida por estreptozotocina. Además, **Bisht et al. (2017)** señalan que el extracto de *U. dioica* mejora el daño causado por las citoquinas inflamatorias. **Patel, Parashar & Udayabanu (2015)**, sugieren que el tratamiento con extracto hidroalcohólico de *U. dioica* revierte los cambios regulados por la diabetes en los niveles de colina acetiltransferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa (AChE). Este efecto

se atribuye a componentes activos de la planta, como la quercetina y la rutina, que pueden inhibir la actividad de AchE, promoviendo la liberación de acetilcolina, intensificando la potenciación a largo plazo en el hipocampo y mitigando el déficit cognitivo.

CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.1.6. Conclusiones

- La presencia significativa de fenoles ($12,27 \pm 1,14$ mg EAG/g PS) y flavonoides totales ($15,43 \pm 0,90$ mg EAG/g PS) fue notable en *U. leptophylla* Kunth en contraste a estudios realizados en otras especies del género *Urtica*, lo que destaca una notable abundancia de estos compuestos, lo que indica un elevado nivel de actividad antioxidante ($62,28 \pm 0,94$ %), sugiriendo así que el extracto etanólico un sólido potencial para combatir radicales libres y aliviar el estrés oxidativo. Lo que puede contribuir a los posibles beneficios terapéuticos del extracto.
- Mediante la realización del ensayo de Laberinto en Cruz Elevado (LCE) en *Mus musculus*, se sugieren que el extracto etanólico presenta un efecto ansiolítico comparable al observado con el clonazepam, esta similitud podría atribuirse a la presencia de componentes bioactivos en las hojas de la ortiga macho, tales como la rutina y la quercetina, compuestos reconocidos por sus propiedades ansiolíticas
- De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el ensayo de DPPH para medir la actividad antioxidante y Bradford, para medir la concentración proteica en el hipocampo del cerebro de *Mus musculus*, se observó que el extracto etanólico de la ortiga macho desempeña un papel beneficioso en el estrés oxidativo, evitando la degradación de proteína y en la regeneración de compuestos antioxidantes.
- El extracto etanólico de ortiga macho presenta una concentración notable de fenoles y flavonoides, indicando una fuerte actividad antioxidante con potencial terapéutico. A través de pruebas de comportamiento en ratones, se sugiere que este extracto posee un efecto ansiolítico comparable a otros medicamentos utilizados en trastornos de ansiedad, atribuible a la presencia de componentes bioactivos. Además, se evidencia que el extracto contribuye

a reducir el estrés oxidativo, previniendo el daño neuronal y consolidando así sus posibles beneficios para la salud.

3.1.7. Recomendaciones

- Utilizar técnicas analíticas avanzadas como cromatografía de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas para identificar y cuantificar los compuestos bioactivos en las hojas de ortiga macho (*Urtica leptophylla* Kunth). Estas herramientas permitirán una caracterización precisa de la composición química.
- Incorporar pruebas adicionales en ratones (*Mus musculus*), como campo abierto o nado forzado, fortalecerá la validez de los resultados y brindará una comprensión más completa del efecto ansiolítico del extracto etanólico de ortiga macho.
- Realizar una evaluación más precisa de la actividad antioxidante y cuantificación de proteínas en el hipocampo mediante técnicas tradicionales y avanzadas como medición de carbonilos y espectrometría de masas. Las pruebas de enzimas antioxidantes y los análisis histológicos darán una visión detallada, enriqueciendo la investigación sobre los efectos del extracto en el tejido cerebral.

MATERIAL DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abubakar, A., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1–10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Abdel-Aziz, S., Abo Elsoud, M., & Anise, A. (2017). Microbial Biosynthesis: A Repertory of Vital Natural Products. In *Food Biosynthesis* (pp. 25–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811372-1.00003-8>
- Abdul Rahim, R., Jayusman, P., Lim, V., Ahmad, N., Abdul Hamid, Z., Mohamed, S., Muhammad, N., Ahmad, F., Mokhtar, N., Mohamed, N., Nazrun Shuid, A., & Naina Mohamed, I. (2022). Phytochemical Analysis, Antioxidant and Bone Anabolic Effects of *Blainvillea acmella* (L.) Philipson. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.796509>
- Ahmadi, S., Abdolmaleki, A., & Jebeli Javan, M. (2023). In silico study of natural antioxidants. In *Vitamins and Hormones* (Vol. 121, pp. 1–43). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.001>
- Ajarem, J., Allam, A., Ebaid, H., Maodaa, S., AL-Sobeai, S., Rady, A., Metwalli, A., Altoom, N., Ibrahim, K., & Sabri, M. (2015). Neurochemical, structural and neurobehavioral evidence of neuronal protection by whey proteins in diabetic albino mice. *Behavioral and Brain Functions*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12993-015-0053-0>
- Alara, O., Abdurahman, N., & Ukaegbu, C. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*, 4, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Albert, P., Vahid-Ansari, F., & Luckhart, C. (2014). Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: Pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00199>

- Alizadeh, K., Esmaeili, R., Shorofi, S., Mousavinasab, N., Espahbodi, F., & Esmaeili, M. (2021). Effect of *Urtica dioica* (nettle) on quality of sleep in hemodialysis patients: A randomized clinical trial. *Journal of Herbal Medicine*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100356>
- Allegra, S., De Francia, S., Turco, F., Bertaggia, I., Chiara, F., Armando, T., Storto, S. & Mussa, M. (2023). Phytotherapy and Drugs: Can Their Interactions Increase Side Effects in Cancer Patients? *Journal of Xenobiotics*, 13(1), 75–89. <https://doi.org/10.3390/jox13010007>
- Allen, M., Sabir, S., & Sharma, S. (2023). GABA Receptor. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Anthierens, S., Pasteels, I., Habraken, H., Steinberg, P., Declercq, T., & Christiaens, T. (2010). Barriers to nonpharmacologic treatments for stress, anxiety, and insomnia: family physicians' attitudes toward benzodiazepine prescribing. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 56(11), e398–e406.
- Apeldoorn, S., Chavez, R., Haschemi, F., Elsherif, K., Weinstein, D., & Torrico, T. (2023). Worsening psychosis associated with administrations of buspirone and concerns for intranasal administration: A case report. *Frontiers in Psychiatry*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1129489>
- Andrade Cáceres, J., & Murillo Mala, M. (2019). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de Aristeguietia glutinosa en ratones Mus musculus*. [Tesis de grado, Escuela Politécnica de Chimborazo]. DSpace ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/13085>
- Anesti, M., Stavropoulou, N., Atsopardi, K., Lamari, F. N., Panagopoulos, N. T., & Margarity, M. (2020). Effect of rutin on anxiety-like behavior and activity of acetylcholinesterase isoforms in specific brain regions of pentylentetrazol-treated mice. *Epilepsy and Behavior*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106632>
- Arcos-Martínez, A., Muñoz-Muñiz, O., Domínguez-Ortiz, M., Saavedra-Vélez, M., Vázquez-Hernández, M., & Alcántara-López, M. (2016). Anxiolytic-like effect

of ethanolic extract of *Argemone mexicana* and its alkaloids in Wistar rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(4), 476–488.

- Assaf, H., Nafady, A., Allam, A., Hamed, A., & Kamel, M. (2020). Phytochemistry and biological activity of family "Urticaceae": a review (1957-2019). *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 150-176. doi: 10.21608/jabps.2020.24043.1073
- Augspole, I., Duma, M., Ozola, B., & Cinkmanis, I. (2017). Phenolic profile of fresh and frozen nettle, goutweed, dandelion and chickweed leaves. In *Proceedings of the 11th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food Science and Technology in a Changing World"*, Jelgava, Latvia. <https://doi.org/10.22616/foodbalt.2017.028>
- Ausderau, K., Colman, R., Kabakov, S., Schultz-Darken, N., & Emborg, M. (2023). Evaluating depression- and anxiety-like behaviors in non-human primates. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1006065>
- Awad, R., Levac, D., Cybulska, P., Merali, Z., Trudeau, V., & Arnason, J. (2007). Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 85(9), 933–942. <https://doi.org/10.1139/Y07-083>
- Ayele, D., Akele, M., & Melese, A. (2022). Analysis of total phenolic contents, flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of *Croton macrostachyus* root extracts. *BMC chemistry*, 16(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13065-022-00822-0>
- Aylett, E., Small, N., & Bower, P. (2018). Exercise in the treatment of clinical anxiety in general practice - A systematic review and meta-analysis. *BMC Health Services Research*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12913-018-3313-5>
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N., & Omar, A. (2013). Techniques for extraction of

- bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azwanida, N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03). doi:10.4172/2167-0412.1000196
- Babaev, O., Piletti Chatain, C., & Krueger-Burg, D. (2018). Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. *Experimental & molecular medicine*, 50(4), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0063-8>
- Balaman, Ş. (2019). Biomass-Based Production Systems. In *Decision-Making for Biomass-Based Production Chains* (pp. 25–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814278-3.00002-9>
- Baldwin, D., Ajel, K., Masdrakis, V., Nowak, M., & Rafiq, R. (2013). Pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder: an update. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 9, 883–892. <https://doi.org/10.2147/NDT.S36453>
- Banda, S., Adams, J., Rajkaran, A., Johnson, J., & Raw, J. (2020). Blue carbon storage comparing mangroves with saltmarsh and seagrass habitats at a warm temperate continental limit. In *Dynamic Sedimentary Environments of Mangrove Coasts* (pp. 447–471). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816437-2.00008-2>
- Bandelow, B., Michaelis, S., & Wedekind, D. (2017). Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*, 19(2), 93–107. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/bbandelow>
- Bencan, Z., Sledge, D., & Levin, E. (2009). Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 94(1), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.07.009>
- Bertoglio, L., & Carobrez, A. (2016). Animal tests for anxiety. In *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research* (pp. 313–326). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11578-8_18

- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. doi:10.1002/jsfa.6706
- Bounds, C., & Nelson, V. (2023). Benzodiazepines. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Bourin M. (2015). Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues in clinical neuroscience*, 17(3), 295–303. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/mbourin>
- Bryant, C., Ferris, M., Villena, F., Imad Damaj, M., Kumar, V., & Mulligan, M. (2018). Reduced complexity cross design for behavioral genetics. In *Molecular-Genetic and Statistical Techniques for Behavioral and Neural Research* (pp. 165–190). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804078-2.00008-8>
- Bisht, R., Joshi, B., Kalia, A., & Prakash, A. (2017). Antioxidant-Rich Fraction of *Urtica dioica* Mediated Rescue of Striatal Mito-Oxidative Damage in MPTP-Induced Behavioral, Cellular, and Neurochemical Alterations in Rats. *Molecular neurobiology*, 54(7), 5632–5645. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0084-z>
- Cachat, J., Canavello, P., Elegante, M., Bartels, B., Hart, P., Bergner, C., Egan, R., Duncan, A., Tien, D., Chung, A., Wong, K., Goodspeed, J., Tan, J., Grimes, C., Elkhayat, S., Suciú C., Rosenberg M., Min Chung, K, Kadri, F., ... Kalueff, A. (2010). Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 208(2), 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.004>
- Cai, L., Tao, Q., Li, W., Zhu, X., & Cui, C. (2022). The anti-anxiety/depression effect of a combined complex of casein hydrolysate and γ -aminobutyric acid on C57BL/6 mice. *Frontiers in nutrition*, 9, 971853. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.971853>

- Campos, A., Fogaça, M., Aguiar, D., & Guimarães, F. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Carlini, E. (2003). Plants and the central nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 501–512. doi:10.1016/s0091-3057(03)00112-6
- Chand, S., & Marwaha, R. (2023). Anxiety. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Chedea, V., & Pop, R. (2019). Total Polyphenols Content and Antioxidant DPPH Assays on Biological Samples. In *Polyphenols in Plants* (pp. 169–183). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00011-6>
- Chioca, L., Ferro, M., Baretta, I., Oliveira, S., Silva, C., Ferreira, J., Losso, E., & Andreatini, R. (2013). Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: Participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(2), 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.028>
- Choi, S., Lee, D., Kim, S., & Jin, B. (2005). Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: role of microglial NADPH oxidase. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(16), 4082–4090. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4306-04.2005>
- Chrousos, G. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374–381. doi:10.1038/nrendo.2009.106
- Cottraux, J. (2002). Nonpharmacological treatments for anxiety disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*, 4(3), 305–319. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2002.4.3/jcottraux>
- Crowe, S., & Stranks, E. (2018). The Residual Medium and Long-term Cognitive Effects of Benzodiazepine Use: An Updated Meta-analysis. *Archives of clinical neuropsychology: the official journal of the National Academy of Neuropsychologists*, 33(7), 901–911. <https://doi.org/10.1093/arclin/acx120>

- Cryan, J., & Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(9), 775–790. <https://doi.org/10.1038/nrd1825>
- Cryan, J., & Sweeney, F. (2011). The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1129–1161. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01362.x>
- Currie, G. (2018). Pharmacology, part 1: Introduction to pharmacology and pharmacodynamics. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 46(2), 81–86. <https://doi.org/10.2967/jnmt.117.199588>
- Daley-Yates, P. (2015). Inhaled corticosteroids: Potency, dose equivalence and therapeutic index. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 80(3), 372–380. <https://doi.org/10.1111/bcp.12637>
- Dar, S., Ganai, F., Yousuf, A., Balkhi, M., Bhat, T., & Sharma, P. (2013). Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical biology*, 51(2), 170–180. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.715172>
- Daviu, N., Bruchas, M., Moghaddam, B., Sandi, C., & Beyeler, A. (2019). Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiology of stress*, 11, 100191. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100191>
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macias, M., & Balsev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. (pp. 1–322). Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Dean, E. (2016). Anxiety. *Nursing Standard*, 30(46), 15–15. [doi:10.7748/ns.30.46.15.s17](https://doi.org/10.7748/ns.30.46.15.s17)
- Dekebo, A. (2019). *Introductory Chapter: Plant Extracts*. Plant Extracts. [doi:10.5772/intechopen.85493](https://doi.org/10.5772/intechopen.85493)
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N., & Kumar, S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania*

somnifera. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1193–S1199.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015>

Di Virgilio, N., Papazoglou, E., Jankauskiene, Z., Di Lonardo, S., Praczyk, M., & Wielgusz, K. (2015). The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Industrial Crops and Products*, 68, 42–49.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.012>

Dobros, N., Zawada, K., & Paradowska, K. (2022). Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of *Lavandula angustifolia* and *Lavandula x intermedia* Cultivars Extracted with Different Methods. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(4), 711. <https://doi.org/10.3390/antiox11040711>

Donelli, D., Antonelli, M., Bellinazzi, C., Gensini, G., & Firenzuoli, F. (2019). Effects of lavender on anxiety: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153099>

Doukkali, Z., Taghzouti, K., Boudida, E., Nadjmouddine, M., Cherrah, Y., & Alaoui, K. (2015). Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. *Behavioral and brain functions: BBF*, 11, 19.
<https://doi.org/10.1186/s12993-015-0063-y>

Doukkali, Z., Taghzouti, K., Boudida, E., Kamal, R., Jemeli, M., Bahia, B., Hanae, H., Zellou, A., Cherrah, Y., & Alaoui, K., (2016a). Small nettle: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze and open field. *Annals of Clinical and Laboratory Research*, 4, 1.

Doukkali, Z., Taghzouti, K., Boudida, E., Kamal, R., El Jemeli, M., Bahia, B., Zellou, A., Cherrah, Y., & Alaoui, K., (2016b). Toxicity and Anxiolytic Property of Nettle in Mice in Light/Dark Test. *International Journal of Clinical Pharmacology & Toxicology*, 1–6. <https://doi.org/10.19070/2167-910x-si03001>

Edinoff, A., Nix, C., Hollier, J., Sagraera, C., Delacroix, B., Abubakar, T., Cornett, E., Kaye, A., & Kaye, A. (2021). *Benzodiazepines: Uses, Dangers, and Clinical Considerations*. *Neurology international*, 13(4), 594–607.
<https://doi.org/10.3390/neurolint13040059>

- Elsherif, K., Sulaiman, M., & Mlitan, A. (2023). Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of *Urtica urens* Leaves from Msallata, Libya. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 13(3), 299-312. <http://doi.org/10.13171/mjc02310181757elsherif>
- Esposito, S., Bianco, A., Russo, R., Di Maro, A., Isernia, C., & Pedone, P. (2019). Therapeutic Perspectives of Molecules from *Urtica dioica* Extracts for Cancer Treatment. *Molecules*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24152753>
- Farhane-Medina, N., Luque, B., Tabernero, C., & Castillo-Mayén, R. (2022). Factors associated with gender and sex differences in anxiety prevalence and comorbidity: A systematic review. *Science progress*, 105(4), 368504221135469. <https://doi.org/10.1177/00368504221135469>
- Farooq, S., Mir, S., Shah, M., & Manickavasagan, A. (2022). Chapter 2 - Extraction techniques. In *Plant Extracts: Applications in the Food Industry* (pp. 23–37). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822475-5.00005-3>
- Fedoce, A., Ferreira, F., Bota, R., Bonet-Costa, V., Sun, P., & Davies, K. (2018). The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence?. *Free radical research*, 52(7), 737–750. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1475733>
- Fedotova, J., Kubatka, P., Büsselberg, D., Shleikin, A., Caprnda, M., Dragasek, J., Rodrigo, L., Pohanka, M., Gasparova, I., Nosal, V., Opatrilova, R., Qaradakhi, T., Zulli, A., & Kruzliak, P. (2017). Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 95, 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.107>
- Fee, C., Prevot, T., Misquitta, K., Banasr, M., & Sibille, E. (2020). Chronic stress-induced behaviors correlate with exacerbated acute stress-induced cingulate cortex and ventral hippocampus activation. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.05.034
- Fernandes, M., & Pedroso, A. (2017). Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)*, 63(11), 923–928. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.11.923>

- Flynn, J., & Melov, S. (2013). SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free radical biology & medicine*, 62, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027>
- Flórez, M., Cazón, P., & Vázquez, M. (2022). Antioxidant Extracts of Nettle (*Urtica dioica*) Leaves: Evaluation of Extraction Techniques and Solvents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(18), 6015. <https://doi.org/10.3390/molecules27186015>
- Fotsing, F., Kezetas, B., El-Saber Batiha, G., Ali, I., & Ndjakou, L. (2022). Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. In *Natural Medicinal Plants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98602>
- Friedman, J. (2011). Why Is the Nervous System Vulnerable to Oxidative Stress? In *Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology* (pp. 19–27). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-514-9_2
- Fuentes, D., Ray, S., & Holstege, C. (2014). *Anxiolytics*. Encyclopedia of Toxicology, 280–286. doi:10.1016/b978-0-12-386454-3.00241-4
- Gahlot, M., Bhatt, P., & Joshi, J. (2018). Study on Yield of Plant Extracts Using Different Solvents and Methods. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci* (pp. 65–67).
- Garakani, A., Murrough, J., Freire, R., Thom, R., Larkin, K., Buono, F., & Iosifescu, D. (2020). Pharmacotherapy of Anxiety Disorders: Current and Emerging Treatment Options. *Frontiers in psychiatry*, 11, 595584. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.595584>
- Gerstner, R., Lara-Lara, F., Vasconez, E., Viscor, G., Jarrin, J., & Ortiz-Prado, E. (2020). Earthquake-related stressors associated with suicidality, depression, anxiety and post-traumatic stress in adolescents from Muisne after the earthquake 2016 in Ecuador. *BMC psychiatry*, 20(1), 347. <https://doi.org/10.1186/s12888-020-02759-x>
- Ghaima, K., Hashim, N., & Ali, S. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(5), 96–99. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3518>

- Ghasemi, M., Navidhamidi, M., Rezaei, F., Azizikia, A., & Mehranfard, N. (2022). Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience*. Springer. <https://doi.org/10.3758/s13415-021-00973-y>
- Große-Veldmann, B. (2017). *Systematics, taxonomy, and evolution of Urtica L. (Urticaceae)* [Doctoral thesis, Universitäts-und Landesbibliothek Bonn]. Bonndoc Repository of the University of Bonn. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5n-46288>
- Gronbach, M., Krauß, L., Broese, T., Oppermann, C., & Kragl, U. (2021). Sublimation for Enrichment and Identification of Marker Compounds in Fruits. *Food Analytical Methods*, 14(6), 1087–1098. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01954-6>
- Grosse-Veldmann, B., Nürk, N., Smissen, R., Breitwieser, I., Quandt, D., & Weigend, M. (2016). Pulling the sting out of nettle systematics - A comprehensive phylogeny of the genus *Urtica* L. (Urticaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.05.019>
- Günther, M., Al Nimer, F., Piehl, F., Risling, M., & Mathiesen, T. (2018). Susceptibility to Oxidative Stress Is Determined by Genetic Background in Neuronal Cell Cultures. *eNeuro*, 5(2), ENEURO.0335-17.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0335-17.2018>
- Harro, J. (2018). Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. *Behavioural Brain Research*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.016>
- Hassoulas, A. (2021). The role of stress in health and disease. In *A Prescription for Healthy Living: A Guide to Lifestyle Medicine* (pp. 77–92). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821573-9.00006-0>
- Hawiset, T., Sriraksa, N., Kamsrijai, U., Wanchai, K., & Inkaew, P. (2022). Anxiolytic and antidepressant-like activities of aqueous extract of *Azadirachta indica* A. Juss. flower in the stressed rats. *Heliyon*, 8(2), e08881. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08881>

- Henriksson, M., Wall, A., Nyberg, J., Adiels, M., Lundin, K., Bergh, Y., Eggertsen, R., Danielsson, L., Kuhn, H., Westerlund, M., Åberg, N., Waern, M., & Åberg, M. (2022). Effects of exercise on symptoms of anxiety in primary care patients: A randomized controlled trial. *Journal of Affective Disorders*, 297, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.10.006>
- Hernandez-Leon, A., González-Trujano, M. E., & Fernández-Guasti, A. (2017). The anxiolytic-like effect of rutin in rats involves GABAA receptors in the basolateral amygdala. *Behavioural pharmacology*, 28(4), 303–312. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000290>
- Hieu, T., Dibas, M., Surya Dila, K., Sherif, N., Hashmi, M., Mahmoud, M., Trang, N., Abdullah, L., Nghia, T., Hirayama, K., & Huy, N. (2019). Therapeutic efficacy and safety of chamomile for state anxiety, generalized anxiety disorder, insomnia, and sleep quality: A systematic review and meta-analysis of randomized trials and quasi-randomized trials. *Phytotherapy research: PTR*, 33(6), 1604–1615. <https://doi.org/10.1002/ptr.6349>
- Hovatta, I., Juhila, J., & Donner, J. (2010). Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neuroscience research*, 68(4), 261–275. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.08.007>
- Huang, J., Xu, F., Yang, L., Tuolihong, L., Wang, X., Du, Z., Zhang, Y., Yin, X., Li, Y., Lu, K., & Wang, W. (2023). Involvement of the GABAergic system in PTSD and its therapeutic significance. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1052288>
- Huda, J., Mohammed, Y., & Imad, H. (2015). Phytochemical analysis of *Urtica dioica* leaves by fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(10), 238–252. doi:10.5897/jpp2015.0361
- Hylander, B., Repasky, E., & Sexton, S. (2022). Using Mice to Model Human Disease: Understanding the Roles of Baseline Housing-Induced and Experimentally Imposed Stresses in Animal Welfare and Experimental Reproducibility. *Animals*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12030371>

- Ibrahim, M., Rehman, K., Razzaq, A., Hussain, I., Farooq, T., Hussain, A., & Akash, M. (2018). Investigations of Phytochemical Constituents and Their Pharmacological Properties Isolated from the Genus *Urtica*: Critical Review and Analysis. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 28(1), 25–66. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018020389>
- Islam, M., Hossain, R., Ahmed, T., Rahaman, M., Al-Khafaji, K., Khan, R., Sarkar, C., Bappi, M., de Andrade, E., Araújo, I., Coutinho, H., Kowalska, G., Kowalski, R., Hanif, M., & Islam, M. (2022). Anxiolytic-like Effect of Quercetin Possibly through GABA Receptor Interaction Pathway: In Vivo and In Silico Studies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(21), 7149. <https://doi.org/10.3390/molecules27217149>
- Jaszczyk, A., Stankiewicz, A., & Juszcak, G. (2022). Dissection of Mouse Hippocampus with Its Dorsal, Intermediate and Ventral Subdivisions Combined with Molecular Validation. *Brain sciences*, 12(6), 799. <https://doi.org/10.3390/brainsci12060799>
- Jerves-Andrade, L., León-Tamariz, F., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Tobar, V., Ansaloni, R., Maes, L., & Wilches, I. (2014). Medicinal plants used in South Ecuador for gastrointestinal problems: An evaluation of their antibacterial potential. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(45), 1310-1320. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5656>
- Jia, S., Hou, Y., Wang, D., & Zhao, X. (2023). Flavonoids for depression and anxiety: a systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2057914>
- Joo, Y., Choi, K., Lee, Y., Kim, G., Lee, D., Roh, G., Kang, S., Cho, G., Choi, W., & Kim, H. (2009). Chronic immobilization stress induces anxiety- and depression-like behaviors and decreases transthyretin in the mouse cortex. *Neuroscience letters*, 461(2), 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.025>

- Kabene, S., & Baadel, S. (2019). Bioethics: a look at animal testing in medicine and cosmetics in the UK. *Journal of medical ethics and history of medicine*, *12*, 15. <https://doi.org/10.18502/jmehm.v12i15.1875>
- Kaczurkin, A., & Foa, E. (2015). Cognitive-behavioral therapy for anxiety disorders: an update on the empirical evidence. *Dialogues in clinical neuroscience*, *17*(3), 337–346. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/akaczurkin>
- Kalogeris, T., Bao, Y., & Korthuis, R. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox biology*, *2*, 702–714. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.006>
- Kapadia, P., Newell, A., Cunningham, J., Roberts, M., & Hardy, J. (2022). Extraction of High-Value Chemicals from Plants for Technical and Medical Applications. *International journal of molecular sciences*, *23*(18), 10334. <https://doi.org/10.3390/ijms231810334>
- Kasper, S., Gastpar, M., Müller, W., Volz, H., Möller, H., Schläfke, S., & Dienel, A. (2014). Lavender oil preparation Silexan is effective in generalized anxiety disorder--a randomized, double-blind comparison to placebo and paroxetine. *The international journal of neuropsychopharmacology*, *17*(6), 859–869. <https://doi.org/10.1017/S1461145714000017>
- Kasper, S., Volz, H., Dienel, A., & Schläfke, S. (2016). Efficacy of Silexan in mixed anxiety-depression--A randomized, placebo-controlled trial. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *26*(2), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.12.002>
- Katerji, M., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2019*, 1279250. <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>
- Kenda, M., Kočevar Glavač, N., Nagy, M., & Sollner Dolenc, M. (2022). Medicinal Plants Used for Anxiety, Depression, or Stress Treatment: An Update.

Molecules (Basel, Switzerland), 27(18), 6021.
<https://doi.org/10.3390/molecules27186021>

- Keshvari, M., Rahmati, M., Mirnasouri, R., & Chehelcheraghi, F. (2020). Effects of endurance exercise and *Urtica dioica* on the functional, histological and molecular aspects of the hippocampus in STZ-Induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112801>
- Khalid, A., Jabeen, Q., & Javaid, F. (2023). Anxiolytic and Antidepressant Potential of Methanolic Extract of *Neurada procumbens* Linn. in Mice. *Dose-response: a publication of International Hormesis Society*, 21(2), 15593258231169584. <https://doi.org/10.1177/15593258231169584>
- Khalifa, N., Noreldin, A., Khafaga, A., El-Beskawy, M., Khalifa, E., El-Far, A., Fayed, A., & Zakaria, A. (2023). Chia seeds oil ameliorate chronic immobilization stress-induced neurodisturbance in rat brains via activation of the antioxidant/anti-inflammatory/antiapoptotic signaling pathways. *Scientific reports*, 13(1), 22409. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49061-w>
- Khan, K., Collier, A., Meshalkina, D., Kysil, E., Khatsko, S., Kolesnikova, T., Yu Morzherin, Y., Warnick, J., Kalueff, A., & Echevarria, D. (2017). Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bph.13754>
- Khare, V., Kushwaha, P., Verma, S., Gupta, A., Srivastava, S., & Rawat, A. (2012). Pharmacognostic Evaluation and Antioxidant Activity of *Urtica dioica* L. *Chinese Medicine*, 03(03), 128–135. <https://doi.org/10.4236/cm.2012.33021>
- Kiani, A., Pheby, D., Henahan, G., Brown, R., Sieving, P., Sykora, P., Marks, R., Falsini, B., Capodicasa, N., Miertus, S., Lorusso, L., Dondossola, D., Tartaglia, G., Ergoren, M., Dundar, M., Michelini, S., Malacarne, D., Bonetti, G., Dautaj, A., ... INTERNATIONAL BIOETHICS STUDY GROUP (2022). Ethical considerations regarding animal experimentation. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 63(2 Suppl 3), E255–E266. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2768>

- Kleemann, J., Koo, H., Hensen, I., Mendieta-Leiva, G., Kahnt, B., Kurze, C., Inclan, D., Cuenca, P., Noh, J., Hoffmann, M., Factos, A., Lehnert, M., Lozano, P. & Fürst, C. (2022). Priorities of action and research for the protection of biodiversity and ecosystem services in continental Ecuador. *Biological Conservation*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109404>
- Kostadinovik, S., & Mitrev, S. (2013). Characterization of fatty acid profile, polyphenolic content and antioxidant activity of cold pressed and refined edible oils from Macedonia. *Journal of Food Chemistry and Nutrition*. <https://eprints.ugd.edu.mk/id/eprint/9269>
- Kregiel, D., Pawlikowska, E., & Antolak, H. (2018). *Urtica* spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7), 1664. <https://doi.org/10.3390/molecules23071664>
- LaFollette, H. (Ed.). (2020). *Ethics in practice: an anthology*. John Wiley & Sons.
- Lai, C. (2020). Task MRI-based functional brain network of anxiety. In Y. Kim (Ed.). *Advances in Experimental Medicine and Biology: Anxiety Disorders* (Vol. 1191, pp. 3–20). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_1
- Lal, N., Sahu, N., Shirale, A., Gurav, P., Rani, K., Meena, B., Diwan, G., & Biswas, A. (2023). Plant Secondary Metabolites and Their Impact on Human Health. In *Nano-Biofortification for Human and Environmental Health* (pp. 295–321). https://doi.org/10.1007/978-3-031-35147-1_15
- Languille, S., Liévin-Bazin, A., Picq, J., Louis, C., Dix, S., De Barry, J., Blin, O., Richardson, J., Bordet, R., Schenker, E., Djelti, F., & Aujard, F. (2015). Deficits of psychomotor and mnesic functions across aging in mouse lemur primates. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 446. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00446>
- Lee, Y., Choi, B., Lee, E., Choi, K., & Sohn, S. (2006). Immobilization stress induces cell death through production of reactive oxygen species in the mouse cerebral cortex. *Neuroscience Letters*, 392(1–2), 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.065>

- Lee, S., & Lee, D. (2018). What is the proper way to apply the multiple comparison test?. *Korean journal of anesthesiology*, 71(5), 353–360. <https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>
- Lezoul, N., Belkadi, M., Habibi, F., & Guillén, F. (2020). Extraction Processes with Several Solvents on Total Bioactive Compounds in Different Organs of Three Medicinal Plants. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(20), 4672. <https://doi.org/10.3390/molecules25204672>
- Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2015). Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and biophysical research communications*, 461(3), 441–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.062>
- Linsambarth, S., Moraga-Amaro, R., Quintana-Donoso, D., Rojas, S., & Stehberg, J. (2017). The Amygdala and Anxiety. In *The Amygdala - Where Emotions Shape Perception, Learning and Memories*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68618>
- Liu, Y., Zhao, J., & Guo, W. (2018). Emotional roles of mono-aminergic neurotransmitters in major depressive disorder and anxiety disorders. *Frontiers in Psychology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02201>
- Lu, S., Wei, F., & Li, G. (2021). The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. *Cell stress*, 5(6), 76–85. <https://doi.org/10.15698/cst2021.06.250>
- Lundstrom, K., Pham, H., & Dinh, L. (2017). Interaction of Plant Extracts with Central Nervous System Receptors. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 4(1), 12. <https://doi.org/10.3390/medicines4010012>
- Lynch M. A. (2009). The multifaceted profile of activated microglia. *Molecular neurobiology*, 40(2), 139–156. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8077-9>
- Mah, L., Szabuniewicz, C., & Fiocco, A. (2016). Can anxiety damage the brain?. *Current opinion in psychiatry*, 29(1), 56–63. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000223>

- Mahan, A., & Ressler, K. (2012). Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends in neurosciences*, 35(1), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.007>
- Mangolini, V., Andrade, L., Lotufo-Neto, F., & Wang, Y. (2019). Treatment of anxiety disorders in clinical practice: A critical overview of recent systematic evidence. *Clinics*. Universidade de Sao Paulo. <https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e1316>
- Mannan, A. (2019). Anxiolytic Effects of the Methanolic Extract of *Bacopa monniera* in Mice. *Pharmacology & Pharmacy*, 10(06), 298–308. <https://doi.org/10.4236/pp.2019.106024>
- Mansouri, M., Soltani, M., Naghizadeh, B., Farbood, Y., Mashak, A., & Sarkaki, A. (2014). A possible mechanism for the anxiolytic-like effect of gallic acid in the rat elevated plus maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 117, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.12.011>
- Mao, J., Xie, S., Keefe, J., Soeller, I., Li, Q., & Amsterdam, J. (2016). Long-term chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) treatment for generalized anxiety disorder: A randomized clinical trial. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 23(14), 1735–1742. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.10.012>
- Mariño Manzano, K. (2023). *Determinación del efecto antioxidante y antimicrobiano de extractos de diferentes tipos de ortiga (Urtica dioica, Urtica urens, Urtica leptophylla, Urtica baccifera) frente a cepas de Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria monocytogenes y Bacillus cereus* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/37948>
- Martin, E., Ressler, K., Binder, E., & Nemeroff, C. (2009). The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. *The Psychiatric clinics of North America*, 32(3), 549–575. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.05.004>

- Marzatico, F., Bertorelli, L., Pansarasa, O., Guallini, P., Torri, C., & Biagini, G. (1998). Brain Oxidative Damage Following Acute Immobilization and Mild Emotional Stress. *International Journal of Stress Management*, 5(4), 223–236. <https://doi.org/10.1023/A:1022969828885>
- Mautong, H., Gallardo-Rumbea, J., Alvarado-Villa, G., Fernández-Cadena, J., Andrade-Molina, D., Orellana-Román, C., & Cherrez-Ojeda, I. (2021). Assessment of depression, anxiety and stress levels in the Ecuadorian general population during social isolation due to the COVID-19 outbreak: a cross-sectional study. *BMC psychiatry*, 21(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s12888-021-03214-1>
- Mcewen, B. (2004). Protection and Damage from Acute and Chronic Stress: Allostasis and Allostatic Overload and Relevance to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032(1), 1–7. doi:10.1196/annals.1314.001
- McLaughlin, K., & Hatzenbuehler, M. (2009). Stressful life events, anxiety sensitivity, and internalizing symptoms in adolescents. *Journal of abnormal psychology*, 118(3), 659–669. <https://doi.org/10.1037/a0016499>
- Moral, I. (2015). Comparación de medias. *Métodos Estadísticos Para Enfermería Nefrológica*, 165–184. <https://www.revistaseden.org/files/12-cap 12.pdf>
- Mzid, M., Ghilissi, Z., Salem, M., Khedir, S., Chaabouni, K., Ayedi, F., Sahnoun, Z., Hakim, A., & Rebai, T. (2018). Chemoprotective role of ethanol extract of *Urtica urens* L. against the toxicity of imidacloprid on endocrine disruption and ovarian morphometric in female rats, GC/MS analysis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97, 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.150>
- Namcela, S., Chiriboga, J., López, I., Serrano, A., & Sigüenza, A. (2022). Evaluación de estrés, ansiedad y depresión en Ecuador durante la pandemia de COVID-19. *La Ciencia Al Servicio de La Salud*, 13(1), 13–25. Retrieved from <http://revistas.esPOCH.edu.ec/index.php/cssn/article/view/667>

- Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatric disease and treatment*, *11*, 165–175. <https://doi.org/10.2147/NDT.S58841>
- Ochoa-de la Paz, L., Gullias-Cañizo, R., D’Abril Ruíz-Leyja, E., Sánchez-Castillo, H., & Parodí, J. (2021). The role of GABA neurotransmitter in the human central nervous system, physiology, and pathophysiology. *Revista Mexicana de Neurociencia*, *22*(2). <https://doi.org/10.24875/rmn.20000050>
- Olson, B., & Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 3. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0304s48>
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., & Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chemistry*, *143*, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.097>
- Owuor, P. (2003). TEA | Chemistry. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 5743–5752. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/01182-2>
- Ozen, T., & Korkmaz, H. (2003). Modulatory effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, *10*(5), 405–415. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00275>
- Patel, S., Parashar, A., & Udayabanu, M. (2015). *Urtica dioica* leaves modulates muscarinic cholinergic system in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice. *Metabolic Brain Disease*, *30*(3), 803–811. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9646-9>
- Patel, S., Ray, R., Sharma, A., Mehta, V., Katyal, A., & Udayabanu, M. (2018). Antidepressant and anxiolytic like effects of *Urtica dioica* leaves in streptozotocin induced diabetic mice. *Metabolic brain disease*, *33*(4), 1281–1292. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0243-1>

- Paz, C., Mascialino, G., Adana-Díaz, L., Rodríguez-Lorenzana, A., Simbaña-Rivera, K., Gómez-Barreno, L., Troya, M., Paez, M., Cárdenas, J., Gerstner, R., & Ortiz-Prado, E. (2020). Behavioral and sociodemographic predictors of anxiety and depression in patients under epidemiological surveillance for COVID-19 in Ecuador. *PloS one*, *15*(9), e0240008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240008>
- Penninx, B., Pine, D., Holmes, E., & Reif, A. (2021). Anxiety disorders. *Lancet (London, England)*, *397*(10277), 914–927. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00359-7)
- Pilz, L., Quiles, C., Dallegrave, E., Levandovski, R., Hidalgo, M., & Elisabetsky, E. (2015). Differential susceptibility of BALB/c, C57BL/6N, and CF1 mice to photoperiod changes. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, *37*(3), 185–190.
- Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., & Romani, A. (2008). Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(19), 9127–9132. <https://doi.org/10.1021/jf801552d>
- Pound, P., & Bracken, M. (2014). Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research?. *BMJ (Clinical research ed.)*, *348*, g3387. <https://doi.org/10.1136/bmj.g3387>
- Quagliato, L., Freire, R., & Nardi, A. (2018). Risks and benefits of medications for panic disorder: a comparison of SSRIs and benzodiazepines. *Expert Opinion on Drug Safety*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14740338.2018.1429403>
- Rafajlovska, V., Kavrakovski, Z., Simonovska, J., & Srbinoska, M. (2013). Determination of protein and mineral contents in stinging nettle. *Quality of Life (Banja Luka) - APEIRON*, *7*(1–2). <https://doi.org/10.7251/qol1301026r>
- Rajurkar, N., & Hande, S. (2011). Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, *73*(2), 146–151. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.91574>

- Raynes, R., Pomatto, L., & Davies, K. (2016). Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. *Molecular aspects of medicine*, 50, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.05.001>
- Reyhanditya, D., Hikmawati, V., Kurnianingsih, N., & Fatchiyah, F. (2022). Restraint Stress Impacts on Behavioral Changes and Adrenal and Kidney Tissue Histopathology of Adult Mice. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. <https://doi.org/10.21776/ub.jkb.2022.032.01.1>
- Romero-Cerecero, O., Islas-Garduño, A., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Jiménez-Ferrer, E., & Tortoriello, J. (2019). Galphimine-B Standardized Extract versus Alprazolam in Patients with Generalized Anxiety Disorder: A Ten-Week, Double-Blind, Randomized Clinical Trial. *BioMed research international*, 2019, 1037036. <https://doi.org/10.1155/2019/1037036>
- Romoleroux, K., Cárata-Tandalla, D., Erler, R., & Navarrete, H. (2019). *Urtica leptophylla* En: *Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi*. Version 2019.0 <<https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Urtica%20leptophylla>>
- Ronquillo, J., Nguyen, M., Rothi, L., Bui-Tu, T., Yang, J., & Halladay, L. (2023). Nature and nurture: comparing mouse behavior in classic versus revised anxiety-like and social behavioral assays in genetically or environmentally defined groups. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2023.06.16.545212. <https://doi.org/10.1101/2023.06.16.545212>
- Samarghandian, S., Samini, F., Azimi-Nezhad, M., & Farkhondeh, T. (2017). Anti-oxidative effects of safranal on immobilization-induced oxidative damage in rat brain. *Neuroscience Letters*, 659, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.065>
- Sancho Cando, A. (2023). *Microencapsulación de compuestos bioactivos a partir de la raíz de cúrcuma (Curcuma longa) y jengibre (Zingiber officinale) como alternativa al uso de antiinflamatorios convencionales* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/37960>

- Sartori, S., Landgraf, R., & Singewald, N. (2011). The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. *Future neurology*, 6(4), 531–571. <https://doi.org/10.2217/fnl.11.34>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 8(1), 1–10.
- Savage, K., Firth, J., Stough, C., & Sarris, J. (2018). GABA-modulating phytomedicines for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Phytotherapy Research*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.5940>
- Semwal, P., Rauf, A., Olatunde, A., Singh, P., Zaky, M., Islam, M., Khalil, A., Aljohani, A., Al Abdulmonem, W., & Ribaud, G. (2023). The medicinal chemistry of *Urtica dioica* L.: from preliminary evidence to clinical studies supporting its neuroprotective activity. *Natural products and bioprospecting*, 13(1), 16. <https://doi.org/10.1007/s13659-023-00380-5>
- Sha, Z., Xu, J., Li, N., & Li, O. (2023). Regulatory Molecules of Synaptic Plasticity in Anxiety Disorder. *International journal of general medicine*, 16, 2877–2886. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S413176>
- Shah, M., Tayab, M., Rahman, A., Hasan, M., Talukder, M., Uddin, A., Javed, M., Chy, M., Paul, A., Rahman, M., Bin Emran, T., & Seidel, V. (2022). Anxiolytic, antidepressant and antioxidant activity of the methanol extract of *Canarium resiniferum* leaves. *Journal of traditional and complementary medicine*, 12(6), 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2022.07.001>
- Shamabadi, A., Hasanzadeh, A., Ahmadzade, A., Ghadimi, H., Gholami, M., & Akhondzadeh, S. (2023). The anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* (lavender): An overview of systematic reviews. *Journal of Herbal Medicine*. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100672>
- Sharma, S., Padhi, S., Kumari, M., Patnaik, S., & Sahoo, D. (2022). Antioxidant Potential of Selected Wild Edible Leafy Vegetables of Sikkim Himalayan

Region: Effects of Cooking Methods and Gastrointestinal Digestion on Activity. *Frontiers in nutrition*, 9, 861347. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.861347>

- Sidaoui, F., Igueld, S., Barth, D., Trabelsi-Ayadi, M., & Cherif, J. (2015). Study of tunisian nettle leaves (*Urtica dioica* L.): Mineral composition and antioxidant capacity of their extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(4), 707–713.
- Shabir, S., Yousuf, S., Singh, S., Vamanu, E., & Singh, M. (2022). Ethnopharmacological Effects of *Urtica dioica*, *Matricaria chamomilla*, and *Murraya koenigii* on Rotenone-Exposed *D. melanogaster*: An Attenuation of Cellular, Biochemical, and Organismal Markers. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1623. <https://doi.org/10.3390/antiox11081623>
- Skaper, S., Facci, L., & Giusti, P. (2014). Neuroinflammation, microglia and mast cells in the pathophysiology of neurocognitive disorders: a review. *CNS & neurological disorders drug targets*, 13(10), 1654–1666. <https://doi.org/10.2174/1871527313666141130224206>
- Smith, K., & Leiras, C. (2018). The effectiveness and safety of *Kava Kava* for treating anxiety symptoms: A systematic review and analysis of randomized clinical trials. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2018.09.003>
- Souza, D., Dos Santos Sales, V., de Souza Rodrigues, C., de Oliveira, L., Santiago Lemos, I., de Araújo Delmondes, G., Monteiro, Á., do Nascimento, E., Sobreira Dantas Nóbrega de Figuiêredo, F., Martins da Costa, J., Pinto da Cruz, G., de Barros Viana, G., Barbosa, R., Alencar de Menezes, I., Bezerra Felipe, C., & Kerntopf, M. (2018). Phytochemical Analysis and Central Effects of *Annona Muricata* Linnaeus: Possible Involvement of the Gabaergic and Monoaminergic Systems. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 17(4), 1306–1317.
- Srivastava, N., Singh, A., Kumari, P., Nishad, J. H., Gautam, V. S., Yadav, M., Bharti, R., Kumar, D., & Kharwar, R. (2020). Advances in extraction technologies:

- Isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. In *Natural Bioactive Compounds: Technological Advancements* (pp. 409–433). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820655-3.00021-5>
- Steimer T. (2011). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues in clinical neuroscience*, 13(4), 495–506. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.4/tsteimer>
- Stephane, F., Jelus, B., Batiha, G., Ali, I., & Bruno, L. (2021). Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. In *Natural Medicinal Plants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98602>
- Stonerock, G., Hoffman, B., Smith, P., & Blumenthal, J. (2015). Exercise as Treatment for Anxiety: Systematic Review and Analysis. *Annals of behavioral medicine: a publication of the Society of Behavioral Medicine*, 49(4), 542–556. <https://doi.org/10.1007/s12160-014-9685-9>
- Strickland, J., & Smith, M. (2014). The anxiolytic effects of resistance exercise. *Frontiers in psychology*, 5, 753. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00753>
- Ströhle, A., Gensichen, J., & Domschke, K. (2018). The Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. *Deutsches Arzteblatt international*, 155(37), 611–620. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0611>
- Ströhle, A. (2019). Sports psychiatry: mental health and mental disorders in athletes and exercise treatment of mental disorders. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 269(5), 485–498. <https://doi.org/10.1007/s00406-018-0891-5>
- Subramanian, P., & Anandharamakrishnan, C. (2023). Extraction of bioactive compounds. In *Industrial Application of Functional Foods, Ingredients and Nutraceuticals* (pp. 45–87). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824312-1.00002-9>
- Susman, J., & Klee, B. (2005). The Role of High-Potency Benzodiazepines in the Treatment of Panic Disorder. *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry*, 7(1), 5–11. <https://doi.org/10.4088/pcc.v07n0101>

- Tabak, O., Gelisgen, R., Erman, H., Erdenen, F., Muderrisoglu, C., Aral, H., & Uzun, H. (2011). Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. Clinical and investigative medicine. *Medecine clinique et experimentale*, 34(3), E163–E171. <https://doi.org/10.25011/cim.v34i3.15189>
- Teleanu, R., Niculescu, A., Roza, E., Vladâcenco, O., Grumezescu, A., & Teleanu, D. (2022). Neurotransmitters-Key Factors in Neurological and Neurodegenerative Disorders of the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 5954. <https://doi.org/10.3390/ijms23115954>
- Toldy, A., Atalay, M., Stadler, K., Sasvári, M., Jakus, J., Jung, K., Chung, H., Nyakas, C., & Radák, Z. (2009). The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(12), 974–981. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.09.001>
- Tong, X., Li, X., Ayaz, M., Ullah, F., Sadiq, A., Ovais, M., Shahid, M., Khayrullin, M., & Hazrat, A. (2021). Neuroprotective Studies on Polygonum hydropiper L. Essential Oils Using Transgenic Animal Models. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580069>
- Trouche, S., Maurice, T., Rouland, S., Verdier, J., & Mestre-Francés, N. (2010). The three-panel runway maze adapted to *Microcebus murinus* reveals age-related differences in memory and perseverance performances. *Neurobiology of learning and memory*, 94(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.04.006>
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Vajić, U. J., Grujić-Milanović, J., Živković, J., Šavikin, K., Godevac, D., Miloradović, Z., Bugarski, B., & Mihailović-Stanojević, N. (2015). Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 74, 912–917. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.032>

- Van Gaalen, M., & Steckler, T. (2000). Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behavioural Brain Research*, *115*(1), 95–106. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00240-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00240-0)
- Van Meer, P., & Raber, J. (2005). Mouse behavioural analysis in systems biology. *The Biochemical journal*, *389*(Pt 3), 593–610. <https://doi.org/10.1042/BJ20042023>
- Walf, A., & Frye, C. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, *2*(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wang, S., Kim, J., Sakong, J., Suh, H., Oh, K., Woo, J., Yoo, S., Lee, S., Lee, S., Lim, S., Cho, S., Chee, I., Chae, J., Hong, J., & Lee, K. (2016). The Efficacy and Safety of Clonazepam in Patients with Anxiety Disorder Taking Newer Antidepressants: A Multicenter Naturalistic Study. *Clinical psychopharmacology and neuroscience: the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, *14*(2), 177–183. <https://doi.org/10.9758/cpn.2016.14.2.177>
- Wilson, T., & Tripp, J. (2023). Bupirone. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- World Health Organization. (2017). *Depression and other common mental disorders: global health estimates* (No. WHO/MSD/MER/2017.2). World Health Organization.
- World Health Organization. (2022a). *Mental disorders*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>
- World Health Organization. (2022b). *Mental Health and COVID-19: Early evidence of the pandemic's impact: Scientific brief, 2 March 2022*.
- Yeung, K., Hernandez, M., Mao, J., Haviland, I., & Gubili, J. (2018). Herbal medicine for depression and anxiety: A systematic review with assessment of potential psycho-oncologic relevance. *Phytotherapy research: PTR*, *32*(5), 865–891. <https://doi.org/10.1002/ptr.6033>

Zhang, Q., Lin, L., & Ye, W. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*, 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zhang, S., Batra, K., Xu, W., Liu, T., Dong, R., Yin, A., Delios, A., Chen, B., Chen, R., Miller, S., Wan, X., Ye, W., & Chen, J. (2022). Mental disorder symptoms during the COVID-19 pandemic in Latin America - a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and psychiatric sciences*, 31, e23. <https://doi.org/10.1017/S2045796021000767>

Anexos

Anexo 1. Autorización de la recolección de muestra vegetal sin fines de lucro para investigación científica del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica



Ministerio del Ambiente, Agua
y Transición Ecológica

AUTORIZACIÓN DE RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA No. 42

ESTUDIANTES E INVESTIGADORES (SIN FINES COMERCIALES)

1.- AUTORIZACIÓN DE RECOLECTA DE ESPECÍMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

2.- CÓDIGO

MAATE-ARSFC-2023-0042

3.- DURACIÓN DEL PROYECTO

FECHA INICIO	FECHA FIN
2023-09-20	2024-09-20

4.- COMPONENTE A RECOLECTAR

Plantae

El Ministerio del Ambiente y Agua, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

5.- INVESTIGADORES /TÉCNICOS QUE INTERVENDRÁN EN LAS ACTIVIDADES DE RECOLECCION

Nº de C.I/Pasaporte	Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Nº REGISTRO SENESCYT	EXPERIENCIA	GRUPO BIOLÓGICO
0604250357	TUBON USCA IRVIN RICARDO	Ecuatoriana	3801148187	Docente Investigador	Magnoliopsida
1850345420	LIBETH ESTEFANIA DOICELA PINGOS	Ecuatoriana	N/A	Ninguna	Magnoliopsida

6.- PARA QUE LLEVEN A CABO LA RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA:

Nombre del Proyecto: Determinación del efecto ansiolítico in vivo del extracto etanólico de ortiga macho -*Urtica leptophylla* Kunth- en ratones -*Mus musculus*-.

7.- SE AUTORIZA LA RECOLECCION CON EL PROPOSITO DE:

Determinar el efecto ansiolítico in vivo del extracto etanólico de ortiga macho (<i>Urtica leptophylla</i>) en ratones (<i>Mus musculus</i>).
Evaluar la capacidad ansiolítica del extracto etanólico in vivo mediante la técnica de puente de cruz elevada.
Determinar la capacidad antioxidante in vitro del extracto etanólico en la especie animal mediante la técnica de DPPH.
Establecer la concentración de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto etanólico.

8.- ÁREA GEOGRÁFICA QUE CUBRE LA RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES O ESPECÍMENES:

PROVINCIAS	SNAP	BOSQUE PROTECTOR
CHIMBORAZO	NA	NA

9.- INFORMACIÓN DE LAS ESPECIES A RECOLECTAR

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE	TIPO MUESTRA	N° MUESTRA	N° LOTE
Magnoliopsida	Rosales	Urticaceae	Urtica	<i>Urtica leptophylla</i>	Hojas	10	

10.- METODOLOGÍA APLICADA EN CAMPO

FASE DE RECOLECCIÓN:	Delimitación del área de muestreo de acuerdo a la presencia y accesibilidad de la planta, Recolectar las hojas de la ortiga macho de manera cuidadosa. Colocar en una bolsa previamente etiquetada con su código respectivo (nombre y parte de la planta, fecha de recolección y ubicación geográfica).
FASE DE PRESERVACIÓN:	Colocar las muestras en un recipiente grande donde no se puedan abollar, Transportar las muestras seguras y almacenar en un lugar fresco y seco hasta su posterior uso.

11. METODOLOGIA APLICADA EN LABORATORIO

MÉTODOS EMPLEADOS EN EL LABORATORIO:	(1) Preparación del extracto etanólico de la ortiga macho. (2) Cuantificación de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico. (3) Medición de la actividad antioxidante del extracto y muestra cerebral del ratón. Metodología: uso del ratón - Se solicitará la emisión de la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). - Se emplearán ratones albinos (Balb/c) macho adultos jóvenes, con edades de entre 2 a 3 meses de edad, y un peso entre 25 y 30 g. Serán adquiridos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (Guayaquil, Ecuador). Durante el período experimental, se alojarán cinco animales por jaula, manteniendo condiciones ambientales estándar ($T^{\circ} 25 \pm 2C$; humedad relativa: 55 a 65 %; luz/oscuridad: 12 horas). La alimentación y agua se proporcionarán mediante contenedores, donde los animales accederán según sus necesidades. Los animales se aclimatarán 1 hora al equipo de puente de cruz elevada por un periodo de 3 días. Para llevar a cabo el estudio, los animales se dividirán en seis grupos, cada uno compuesto por cinco ratones. Se conformará un grupo de control y cinco grupos de estrés. Los animales del grupo de estrés se dividirán en un grupo positivo, administrando diazepam a una dosis de 1 mg/kg, un grupo control sin medicación y tres grupos experimentales tratadas con <i>U. leptophylla</i> a dosis de 100, 200 y 400 mg/kg de peso corporal. Se administrarán los medicamentos una vez al día por vía oral por una sonda de 9:00 a 10:00 a.m., por 30 días consecutivos. 30 minutos después del tratamiento, se someterá a los
---	---

	animales a una inmovilización durante 3 horas para inducir estrés. La prueba comportamental se realizará en los días 1, 15 y 30 después de 30 minutos de estrés. Al concluir el experimento, se procederá al sacrificio de los animales mediante inyección intraperitoneal de tiopental sódico, utilizando una dosis de 40 mg/kg de peso corporal.
--	--

12.- SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA RECOLECCION.

Grupo Biológico a Recolectar	Descripción	Tipo de Equipamiento
Magnoliopsida	BANDEJAS, FUNDAS	Material en Campo
Magnoliopsida	TIJERA DE PODAR, PERIÓDICO, LIBRETA DE CAMPO, CANASTA PARA RECOLECTAR	Equipo en Campo

13.- COLECCIONES NACIONALES DEPOSITARIAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Magnoliopsida	Herbario Escuela superior Técnica del Chimborazo
---------------	--

14.- RESULTADOS ESPERADOS

1. Mediante la preparación del extracto etanólico de la ortiga macho se espera obtener metabólicos secundarios presentes en la matriz vegetal. 2. Al determinar fenoles y flavonoides del extracto etanólico se espera obtener resultados que proporcionen una medida cuantitativa de la cantidad total de fenoles y flavonoides presentes en el extracto etanólico, siendo importantes debido a sus propiedades antioxidantes y otros beneficios potenciales para la salud. 3. Mediante la actividad antioxidante se espera obtener resultados que proporcionen información sobre la capacidad antioxidante del extracto etanólico., siendo importante porque los antioxidantes pueden ayudar a proteger las células del estrés oxidativo y el daño causado por los radicales libres. Mientras que en el cerebro, se espera obtener información sobre la evaluación del potencial antioxidante en el tejido cerebral, obteniendo una posible reducción en la absorción de DPPH, lo que indicaría que se están neutralizando los radicales libres, también los resultados podrían mostrar cómo los compuestos antioxidantes presentes en el tejido pueden influir en la mitigación del estrés oxidativo y potencialmente proteger las células nerviosas.

15.- CONTRIBUCIÓN DEL ESTUDIO PARA LA TOMA DE DECISIONES A LA ESTRATEGIA NACIONAL DE BIODIVERSIDAD 2011-2020.

METAS	DESCRIPCIÓN
Resultado04.19El Ecuador, bajo la coordinación del Instituto de Investigaciones de la Biodiversidad, impulsa la investigación científica aplicada y la gestión del conocimiento sobre el patrimonio natural y desarrolla procesos tecnológicos innovadores que sustentan el cambio	La investigación de la ortiga macho para tratar la ansiedad es culturalmente importante, ya que preservará y promoverá el conocimiento de prácticas tradicionales de la medicina natural, ofreciendo una alternativa natural a los

de la matriz productiva	medicamentos sintéticos.
-------------------------	--------------------------

DE ACUERDO A LAS SIGUIENTES ESPECIFICACIONES

1. Solicitud de: **LIBETH ESTEFANIA DOICELA PINGOS**
2. Institución Nacional Científica : **UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO U.T.A.**
3. Fecha de entrega del informe final o preliminar: **2024/09/05**
4. Valoración técnica del proyecto: **TELLO RAMOS FANNY ELIZABETH**
5. Esta Autorización **NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS Y HONGOS.**
6. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA, FAUNA, MICROORGANISMOS Y HONGOS**, sin la correspondiente autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.
7. Los especímenes o muestras recolectadas no podrán ser utilizadas en actividades de **BIOPROSPECCIÓN, NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO.**
8. Los resultados que se desprendan de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente y Agua.

OBLIGACIONES DEL/ LOS INVESTIGADOR/ES.

9. Ingresar al sistema electrónico de recolecta de especímenes de especies la diversidad biológica del ministerio del ambiente y agua, el o los informes parciales o finales en formato PDF, en el formato establecido.

Con los siguientes anexos:

- Escaneado de el o los certificados originales del depósito o recibo de las muestras, emitidas por las Colecciones Científicas Ecuatorianas como Internacionales depositarias de material biológico.
- Escaneado de las publicaciones realizadas o elaboradas en base al material biológico recolectado.
- Escaneado de material fotográfico que considere el investigador pueda ser utilizados para difusión. (se mantendrá los derechos de autor).

10. Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos el número de Autorización de Recolección otorgada por el Ministerio del Ambiente y Agua, con el que se recolectó el material biológico.

11. Depositar los holotipos en una institución científica depositaria de material biológico.

12. Los holotipos solo podrán salir del país en calidad de préstamo por un periodo no más de un año.

13. Las muestras biológicas a ser depositadas deberán ingresar a las colecciones respectivas siguiendo los protocolos emitidos por el Curador/a custodio de los especímenes.

14. Las muestras deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se responsabiliza a **LIBETH ESTEFANIA DOICELA PINGOS**.

DIRECTOR DE BIODIVERSIDAD
CARVAJAL PARRA EDISON XAVIER
2024-01-15



**Anexo 2. Permiso de manipulación de animales de experimentación extendido por la
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).**



**Escuela
Superior Politécnica
de Chimborazo**
50 AÑOS

**Facultad de
Ciencias**

Oficio Nro. ESPOCH-CIBE-2023-0037

Riobamba, 13 de octubre de 2023

Asunto: AVAL CBIESPOCH

Señora Licenciado
Danae Fernández Rivero.
Docente
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
En su Despacho

De mi consideración:

Reciba un cordial saludo, a la vez que me dirijo a usted para comunicarle que, luego de la evaluación por pares, el proyecto de titulación "Determinación del efecto ansiolítico in vivo del extracto etanólico de ortiga macho (*Urtica leptophylla* Kunth) en ratones (*Mus musculus*)", me permito indicar que fue APROBADO sin ninguna observación, por lo tanto, se extiende el AVAL por parte del Comité de Bioética en Investigación de la ESPOCH

Con sentimientos de distinguida consideración.

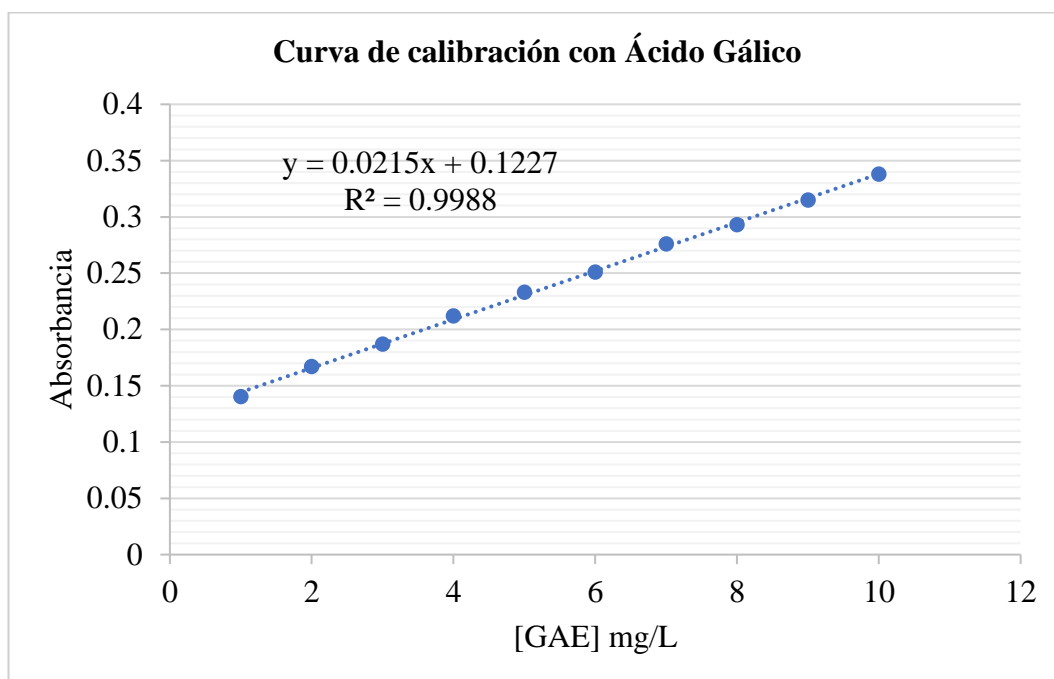
Atentamente,
SABER PARA SER



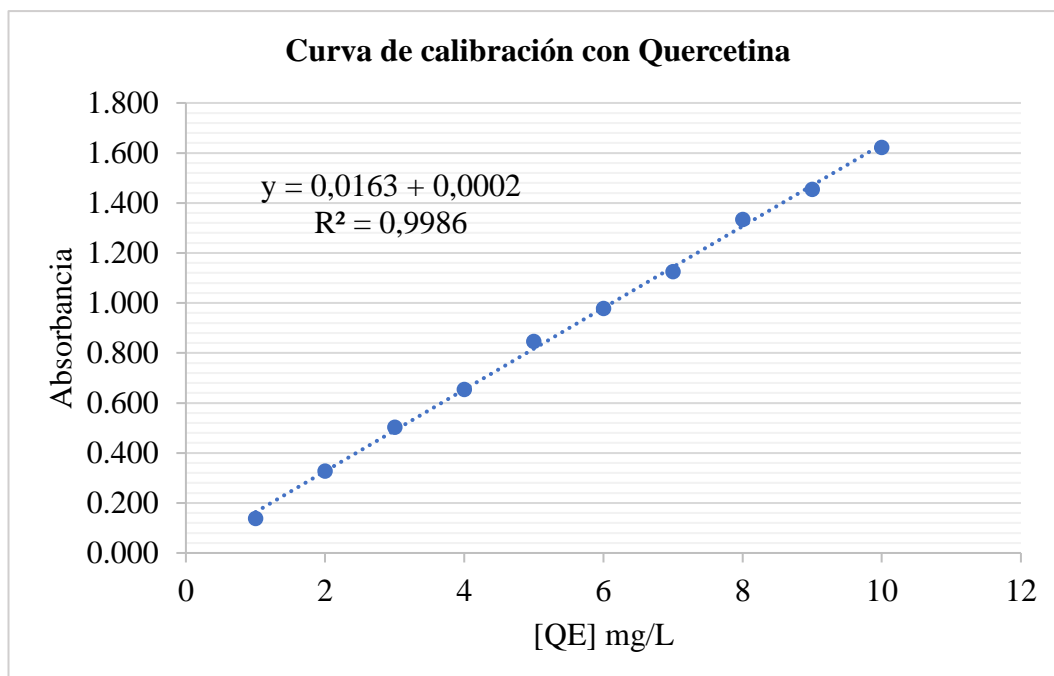
Ing. María Rafaela Viteri Uzcátegui, MsC.
PRESIDENTA DEL COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA



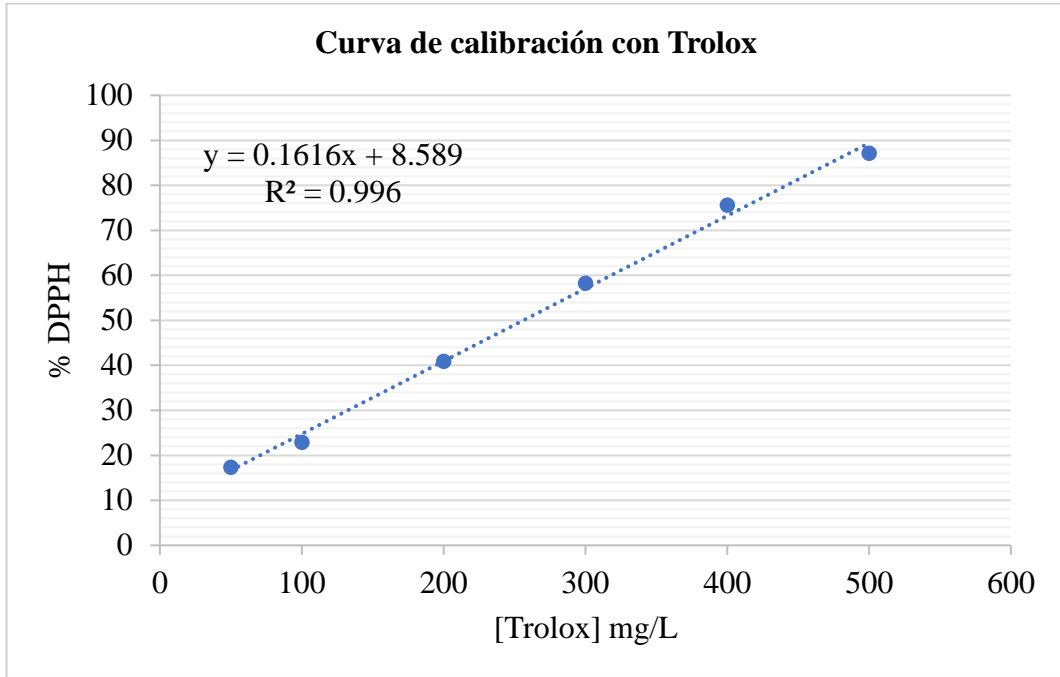
Anexo 3. Curva de calibración con Ácido Gálico para flavonoides totales.



Anexo 4. Curva de calibración con Quercetina para fenoles totales.



Anexo 5. Curva de calibración con Trolox para actividad antioxidante.



Anexo 6. Curva de calibración con BSA para proteínas.

