



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ - SC
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

AMANDA GOLLO BERTOLLO

**POTENCIAL EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DE
EXTRATO E COMPOSTO ATIVO DA *Centella asiatica* EM RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS A ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA**

CHAPECÓ

2022

AMANDA GOLLO BERTOLLO

**POTENCIAL EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DE
EXTRATO E COMPOSTO ATIVO DA *Centella asiatica* EM RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS A ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Enfermagem da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Enfermagem.

Orientadora: Prof^a Dr^a Zuleide Maria Ignácio

CHAPECÓ

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Bertollo, Amanda Gollo
POTENCIAL EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E
ANTIINFLAMATÓRIO DE EXTRATO E COMPOSTO ATIVO DA Centella
asiatica EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A ESTRESSE NO
INÍCIO DA VIDA / Amanda Gollo Bertollo. -- 2022.
46 f.

Orientadora: Dr^a Zuleide Maria Ignácio

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Enfermagem, Chapecó, SC, 2022.

1. Transtorno Depressivo Maior. 2. Privação Maternal.
3. Neuroinflamação. 4. Centella asiatica. 5. Ácido
madecássico. I. Ignácio, Zuleide Maria, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AMANDA GOLLO BERTOLLO

**POTENCIAL EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DE
EXTRATO E COMPOSTO ATIVO DA *Centella asiatica* EM RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS A ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Enfermagem da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Enfermagem.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 05/04/2022

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Zuleide Maria Ignácio – UFFS
Orientadora



Profª. Dra. Margarete Dulce Bagatini – UFFS
Avaliadora



Profª. Me. Lilian Caroline Bohnen - UNOCHAPECÓ
Avaliadora



Profª. Dra. Adriana Remião Luzardo - UFFS
Terceiro membro/membro suplente

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Noeli Gollo

Por me estimular a continuar sempre estudando

Agradeço por me auxiliar e apoiar em todos os momentos.

À minha irmã, Maisa Gollo Bertollo

Por me incentivar a melhorar sempre e em todos os sentidos da vida

Você é inspiração

Agradeço você por fazer meus dias mais felizes.

À minha família,

Agradeço por estarem ao meu lado nos momentos bons e nos momentos difíceis

Não teria conseguido sem o suporte de vocês.

À minha orientadora, Zuleide Maria Ignácio,

Por me ensinar e orientar de forma calma e humilde

Por estar sempre disponível para sanar as minhas dúvidas

És um exemplo de orientadora, mulher e pesquisadora

Agradeço por me acompanhar nesta jornada.

Agradeço a todos os amigos, professores e colegas que me acompanharam nesta jornada e auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa. Ela não teria sido possível sem a contribuição de vocês!

RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) é um transtorno grave e que causa enorme perda da qualidade de vida das pessoas, sendo uma das formas mais prevalentes de doença mental. Entre os fatores mais relevantes subjacentes ao TDM está o estresse na infância. A privação maternal (PM) em roedores é um modelo comportamental que mimetiza os traumas no início da vida das pessoas. Em indivíduos com TDM, alguns estudos vêm observando um aumento de liberação de citocinas inflamatórias no sistema nervoso central. A espécie medicinal *Centella asiatica* (*C. asiatica*) vem sendo estudada por seu potencial efeito neuroprotetor e antidepressivo. Objetivou-se avaliar o efeito do estresse de PM nos primeiros dias de vida em comportamentos tipo depressivos e na neuroinflamação hipocampal de ratos adultos jovens, e o efeito do tratamento com o extrato de *C. asiatica* e o seu composto ativo ácido madecássico nos comportamentos tipo depressivos e na possível neuroinflamação. Os animais foram divididos em cinco grupos (N = 10 cada grupo): Controle sem estresse + veículo (Controle sem estresse); PM + veículo (Controle negativo); PM + Escitalopram (controle positivo) 10 mg/kg; PM + Extrato de *C. asiatica* 30 mg/kg; PM + ácido madecássico 10 mg/kg. Os animais foram submetidos à PM por 10 dias após o primeiro dia de nascimento. Com sessenta dias de idade, os animais foram submetidos ao tratamento crônico por 14 (quatorze) dias de acordo com o objetivo de cada grupo. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos aos protocolos de atividade locomotora no campo aberto e desespero comportamental no teste de natação forçada. Após o último teste, os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi retirado e armazenado em temperatura aproximada de -70°C, para posterior análise da atividade de citocinas inflamatórias. O protocolo de PM induziu comportamentos tipo depressivos e prejuízos nas funções biológicas, como aumento de citocinas inflamatórias no hipocampo. O extrato e o composto ativo da *C. asiatica* reverteram ou reduziram os comportamentos tipo depressivos e a inflamação no hipocampo. O estudo é relevante para a área da enfermagem, considerando que questões de saúde mental estão presentes em todas as dimensões de atuação do enfermeiro.

Palavras-chave: Transtorno Depressivo Maior; Privação Maternal; Neuroinflamação; *Centella asiatica*; Ácido madecássico.

ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) is a serious disorder that causes enormous loss of people's quality of life, one of the most prevalent forms of mental illness. Among the most relevant factors underlying MDD is childhood stress. In rodents, maternal deprivation (MD) is a behavioral model that mimics traumas early in people's lives. In individuals with MDD, some studies have observed an increase in the release of inflammatory cytokines in the central nervous system. The medicinal species *Centella asiatica* (*C. asiatica*) has been studied for its potential neuroprotective and antidepressant effects. The objective of this study was to evaluate the effect of MD stress in the first days of life on depressive-like behaviors and hippocampal neuroinflammation in young adult rats and the effect of treatment with *C. asiatica* extract and its active compound madecassic acid on type-like behaviors. Depression and possible neuroinflammation. The animals were divided into five groups (N = 10 each group): Control without stress + vehicle (Control without stress); MD + vehicle (Negative control); MD + Escitalopram (positive control) 10 mg/kg; MD + *C. asiatica* extract 30 mg/kg; MD + madecassic acid 10 mg/kg. The animals were submitted to MD 10 days after the first day of birth. At sixty days of age, the animals were submitted to chronic treatment for 14 (fourteen) days according to the objective of each group. At the end of the treatment, the animals were submitted to protocols of locomotor activity in the open field and behavioral despair in the forced swimming test. After the last test, the animals were euthanized, and the hippocampus was removed and stored at a temperature of approximately -70°C for later analysis of the activity of inflammatory cytokines. The MD protocol induced depressive-like behaviors and impairments in biological functions, such as increased inflammatory cytokines in the hippocampus. The *C. asiatica* extract and active compound reversed or reduced depressive-like behaviors and inflammation in the hippocampus. The study is relevant to nursing, considering that mental health issues are present in all dimensions of the nurse's work.

Keywords: Major Depressive Disorder; Maternal Deprivation; Neuroinflammation; *Centella asiatica*; Madecassic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho Experimental

Figura 2 - Teste de Natação Forçada

Figura 3 - Atividade Locomotora no Campo Aberto

Figura 4 - Atividade da IL-1 β e IL-6 no Hipocampo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlCl ₃	Cloreto de alumínio
AChE	Acetilcolinesterase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
<i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica</i>
CID	Decomposição induzida por colisão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESI	Electropulverização
EM	Espectrometria de Massa
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
GSH-Px	Glutathione peroxidase
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeos
MDA	Malondialdeído
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PM	Privação maternal
SOD	Superóxido dismutase

TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UNOCHAPECÓ	Universidade Comunitária da Região de Chapecó

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 MATERIAL VEGETAL	20
4.2 PRODUÇÃO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE <i>C. asiatica</i>	20
4.3 ANÁLISES QUÍMICAS DE EXTRATOS DE <i>C. asiatica</i>	20
4.4 AQUISIÇÃO DO COMPOSTO ATIVO ÁCIDO MADECÁSSICO	21
4.5 AQUISIÇÃO DO ESCITALOPRAM	21
4.6 PRIVAÇÃO MATERNAL	21
4.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS	22
4.8 TESTES COMPORTAMENTAIS	22
4.9 COLETA DE TECIDOS	23
4.10 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS	24
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4.12 ASPECTOS ÉTICOS	25
4.13 DEVOLUTIVA DOS ESTUDOS	25
5. RESULTADOS	27
5.1 EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO	27
5.2 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNAL E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO	28
5.3 ATIVIDADE DA IL-1 β E IL-6 NO HIPOCAMPO	29
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO A - Carta de aprovação da pesquisa pelo CEUA da UNOCHAPECÓ	46

1 INTRODUÇÃO

Estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que o Transtorno Depressivo Maior (TDM) afetava, em 2017, mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo e contribuiu para a maior porcentagem de incapacidades. O TDM é considerado a principal causa de mortes por suicídio, contribuindo para 800.000 suicídios por ano. Dados mostram que em 2015 o suicídio foi a segunda principal causa de morte entre jovens de 15 a 29 anos em todo o mundo (WHO, 2017).

O TDM apresenta etiologia multifatorial, podendo incluir eventos traumáticos e estresse crônico no início da vida e na vida adulta, e pode ser acompanhado por diversas comorbidades, como doenças metabólicas e cardiovasculares, dependência química, entre outros fatores que podem reduzir drasticamente a qualidade de vida das pessoas acometidas. Pacientes que sofrem de depressão severa apresentam altos níveis de morbidade e mortalidade, com consequências econômicas e sociais profundas (NEMEROFF; OWENS, 2002). Além de ser uma doença crônica e recorrente, o TDM envolve constante preocupação e expectativas ruins (KELLER et al., 1992; MUELLER et al., 1999; TEN HAVE et al., 2018).

Alteração no funcionamento dos sistemas de neurotransmissão é uma das características básicas envolvidas no TDM, e os tratamentos antidepressivos clássicos apresentam como principal mecanismo o controle dos neurotransmissores. A fisiopatologia do TDM envolve diminuição dos níveis cerebrais de serotonina, noradrenalina e dopamina, e esta situação contribui com os sintomas comportamentais característicos do transtorno (FREY; MCCABE, 2020; KATZ et al., 1994).

Uma das regiões cerebrais vulneráveis ao estresse e ao TDM é o hipocampo, considerando que esta região está relacionada com a modulação de emoções e regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). No TDM o hipocampo apresenta altos níveis inflamatórios, redução da plasticidade neuronal e redução do volume hipocampal (BARCH et al., 2019; SONG et al., 2020; XU et al., 2015).

Embora a literatura científica seja extensa nas investigações de transtornos depressivos, os resultados ainda estão longe de elucidar mecanismos biológicos convergentes e, conseqüentemente, estão longe de sugerir um tratamento mais efetivo, rápido e,

principalmente, que induza resposta terapêutica a todos os indivíduos que sofrem deste transtorno psiquiátrico.

Considerando a relevância da doença é necessário elucidar os eventos que podem desencadear a depressão. Entre os fatores psicossociais, um grande número de evidências destaca que o estresse na infância é um dos fenômenos mais potentes em precipitar a expressão de um genótipo predisponente ao TDM (IGNÁCIO et al., 2014). Um aspecto fundamental é que o estresse no início da vida parece estar envolvido na gravidade do transtorno e na pobre resposta aos tratamentos antidepressivos, tanto em humanos (WILLIAMS et al., 2016) quanto em animais submetidos a protocolos de separação maternal (ZHANG et al., 2015). Roedores submetidos a protocolos de privação maternal (PM) nos primeiros dias de vida apresentaram aumento significativo de comportamentos depressivos em testes de natação forçada (RÉUS et al., 2015; IGNÁCIO et al., 2017a). Um aspecto relevante que emerge da utilização do modelo de separação maternal é o fato de mimetizar uma situação grave de violência, abandono e falta de cuidado em crianças humanas, sendo considerado um dos mais poderosos estressores naturais durante o desenvolvimento (IGNÁCIO et al., 2017a).

É possível perceber a importância de buscar alternativas eficazes e que apresentem menos efeitos adversos no tratamento de TDM. Nesse cenário a espécie *Centella asiatica* (*C. asiatica*), utilizada popularmente de forma milenar, apresenta ser uma estratégia terapêutica efetiva. Alguns estudos vêm destacando esta espécie medicinal como possibilidade de intervenção e efeito benéfico no TDM (JANA et al., 2010) e na plasticidade neuronal. Os efeitos neuroprotetores abrangem diversos mecanismos moleculares e estruturais, como ações benéficas sobre o eixo HPA e inflamação (LOKANATHAN et al., 2016). Os estudos sobre os extratos e compostos ativos da *C. asiatica* sugerem sua relevância como estratégia farmacológica terapêutica para o TDM, bem como sua função em mecanismos biológicos subjacentes (LIN; HUANG; HUNG, 2016; WANG et al., 2020).

O TDM prejudica a qualidade de vida e está relacionado a altos índices de morbimortalidade, sendo uma doença crônica e recorrente. Estudos indicam que o estresse na infância aumenta o risco de desenvolver TDM na vida adulta, principalmente se houver estresse crônico nesta fase da vida. Muitos pacientes não respondem efetivamente aos antidepressivos clássicos, instigando a procura por novas possibilidades terapêuticas. Portanto, este estudo avaliou o efeito do estresse de PM no desencadeamento de

comportamentos tipo depressivos e no aumento da neuroinflamação hipocampal na vida adulta. Paralelamente, este estudo investigou o efeito do extrato de *C. asiatica* e o composto ativo ácido madecássico como potenciais terapêuticos, revertendo ou reduzindo comportamentos tipo depressivos e a neuroinflamação hipocampal.

Com base nas informações citadas acima, esta pesquisa tem duas hipóteses: 01) O protocolo de PM induz comportamentos tipo depressivos e neuroinflamação hipocampal; 2) O tratamento crônico com *C. asiatica* e seu composto ativo ácido madecássico revertem ou reduzem os comportamentos tipo depressivos e os marcadores de neuroinflamação hipocampal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do tratamento com extrato de folhas da espécie *C. asiatica* e seu composto ativo ácido madecássico sobre comportamentos tipo depressivos e mecanismos pró-inflamatórios em ratos submetidos a estresse de PM nos primeiros dias de vida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar comportamentos tipo depressivos em ratos machos adultos que foram submetidos a estresse de PM nos primeiros dias de vida;
- Avaliar o efeito do estresse de PM na expressão das citocinas inflamatórias no hipocampo de ratos adultos;
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com extrato da *C. asiatica* e o composto ativo ácido madecássico nos possíveis comportamentos tipo depressivos e neuroinflamação hipocampal em ratos adultos que sofreram PM.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

O TDM é um sério transtorno que causa enormes danos à qualidade de vida das pessoas e é uma das formas mais prevalentes de doença mental (LARSEN et al., 2010). Estudos têm observado que o estresse na infância é um dos fenômenos mais potentes na precipitação da expressão de um genótipo predisponente ao TDM (DASKALAKIS et al., 2013; IGNÁCIO et al., 2014).

Dados de pesquisa sobre plasticidade neural mostram que o estresse pode exercer vários efeitos em diferentes regiões e funções cerebrais, fato que estimula a pesquisa na busca por mecanismos subjacentes aos diversos efeitos do estresse. Dentre os vários mecanismos neurais, a função de neurotransmissores, além dos monoaminérgicos, bem como os mecanismos celulares de ação, os fatores neurotróficos e a plasticidade neuronal, de acordo com a evolução da pesquisa, parecem constituir um conjunto muito importante de mecanismos para a compreensão da fisiopatologia do TDM.

Entre vários fenômenos biológicos, muitos estudos destacaram que mudanças no balanço oxidativo estão envolvidas na patogênese da TDM (ZHOU et al., 2007; JOU; CHIU; LIU, 2009; STRECK et al., 2014; CHE et al., 2015; GARABADU; AHMAD; KRISHNAMURTHY, 2015). Muitos parâmetros indicativos de estresse oxidativo estão alterados em pacientes com TDM (RAWDIN et al., 2013), bem como em animais submetidos a estresse e manifestando comportamentos semelhantes à depressão (SHAHZAD et al., 2014; EKEANYANWU; NJOKU, 2015). Além disso, o estresse de privação maternal pode causar desregulação nos parâmetros do balanço oxidativo, levando ao estresse oxidativo nas regiões cerebrais envolvidas com a depressão (RÉUS et al., 2015). Também é importante enfatizar que o estresse oxidativo está relacionado à gravidade do TDM e à depressão resistente a tratamento (DRT) (MOKOENA et al., 2015). Entre os vários mecanismos nos quais o estresse oxidativo pode exercer influência, estão modificações em uma variedade de moléculas biológicas, ativação de diferentes fatores de transcrição e consequente aumento de citocinas anti e pró-inflamatórias (BIRBEN et al., 2012). Por outro lado, através da ativação de células inflamatórias, os pacientes com TDM apresentam aumento dos marcadores de estresse oxidativo (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015).

Estudos clínicos e experimentais indicam que o estresse e a depressão estão associados ao aumento da atividade do sistema imune na inflamação, incluindo a função de alguns leucócitos e o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (DINAN, 2009). As citocinas também interagem com as vias relacionadas ao TDM, incluindo o metabolismo dos neurotransmissores, funções neuroendócrinas e plasticidade neural (DANTZER et al., 2008). Pacientes com depressão apresentam níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, como interleucinas (IL) (IL-1, IL-2 e IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (DOWLATI et al., 2010).

O uso de plantas medicinais é uma prática muito antiga e difundida em vários locais do mundo com o objetivo de tratamento, prevenção e cura de diversas doenças. Em vários casos essa prática apresenta maior aceitação pela população por ser uma prática tradicional de muitos povos. Além disso, o uso de plantas medicinais garante menos riscos e efeitos adversos do que o uso de fármacos clássicos (SOUZA, GODINHO, 2020; LIMA et al., 2019).

Desde o final dos anos 50 os fármacos antidepressivos são utilizados e apresentam eficácia comprovada. Estes medicamentos vêm salvando milhares de vidas por reduzir os casos de depressão em todo o mundo. No mercado farmacêutico há diversas substâncias disponíveis, e a escolha recomendada pelo profissional será diferenciada para cada paciente, baseando-se nas características clínicas, medicamentos já tomados anteriormente e sua eficácia, além dos possíveis efeitos secundários que determinado fármaco pode apresentar. O acompanhamento profissional garante uma atenção individual para cada paciente, pois cada um responde ao fármaco de uma forma. Com essa avaliação constante é possível verificar a eficácia do fármaco e a possível resistência ao tratamento (NEVES, 2015; CABRERA, 2016).

Apesar do grande avanço dessa classe medicamentosa, é muito comum encontrar em diversos serviços de saúde algumas dificuldades no uso dos antidepressivos devido a problemas secundários e a dificuldade na adesão do tratamento. Estudos indicam que cerca de 30% a 40% dos pacientes acabam não aderindo ao tratamento. Já a parcela dos pacientes que aderem ao tratamento pode desenvolver uma resistência à ação dos fármacos, desenvolvendo assim uma depressão resistente ao tratamento antidepressivo clássico disponível na clínica (NEVES, 2015; CABRERA, 2016).

Uma alta taxa de pacientes apresentam resistência e/ou diversos efeitos colaterais aos medicamentos disponíveis, fazendo com que o processo de encontrar um fármaco adequado leve tempo, criando assim uma grande dificuldade em fazer com que haja adesão do paciente

ao tratamento. Em países desenvolvidos somente 50% dos pacientes aceitam tratamentos contínuos, e com esse dado pode-se supor que a porcentagem de pacientes que aceitam tratamentos contínuos em países em desenvolvimento seja menor, devido a menor condição financeira e menos acesso a serviços de saúde, apontando a necessidade de descobertas de novas estratégias que possibilitem ampliar a adesão e eficiência do medicamento (NEVES, 2015; SOUZA; KORPITTKKE 2016). Assim, as plantas medicinais estão no rol de potenciais estratégias e são alvos de investigação acerca dos mecanismos e efetividade nas respostas terapêuticas.

Uma espécie amplamente estudada é a *Hypericum perforatum*, conhecida popularmente como Erva de São João. A hipótese mais aceita pela comunidade científica é que a *Hypericum perforatum* inibe a recaptação das monoaminas, garantindo um equilíbrio delas nas fendas sináptica. A erva de São João pode ter efeitos benéficos em casos leves e moderados, quando há o controle na produção da planta e as substâncias que a compõem (SOUZA; GODINHO, 2020). Outra planta muito citada em estudos e presente no cotidiano do brasileiro é a *Matricaria recutita* L., conhecida popularmente como camomila. A planta apresenta efeitos positivos no tratamento de TDM. Ela apresenta baixa chance de toxicidade e grande aceitação pelo público devido ao conhecimento popular (LIMA; FILHO; OLIVEIRA, 2019).

Após a leitura de diversos artigos publicados recentemente foi possível constatar a importância das ervas medicinais como opção medicamentosa ou terapia auxiliar no tratamento do TDM, visto que pode abranger muitos pacientes que não obtiveram sucesso em abordagens clássicas e considerando que diversas plantas apresentam baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais em comparação com os fármacos disponíveis na clínica atualmente (SOUZA; GODINHO, 2020; LIMA et al., 2019; LIMA; FILHO; OLIVEIRA, 2019).

A *C. asiatica* já é conhecida e usada como medicamento ou tratamento para diversas doenças desde a pré-história. Ela é usada principalmente em forma medicamentosa para úlceras estomacais, celulites e na melhoria da circulação em membros. Além disso, também é utilizada de forma tópica pois auxilia na cicatrização de feridas e na produção de colágeno. Pesquisas indicam que a *C. asiatica* demonstra efeitos ansiolíticos, antidepressivos e auxilia na regulação do sono (DUTRA, 2019).

O extrato de *C. asiatica* foi capaz de aumentar os níveis hepáticos de superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px), ao mesmo tempo que reduziu

malondialdeído (MDA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos, em doses de 100 a 500 mg/kg/dia (ZHAO et al., 2014). Também teve efeito anti-inflamatório ao inibir a expressão sérica de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, e imunoglobulina E (IgE), e também inibiu a liberação de óxido nítrico, ciclo-oxigenase-2 (COX-2), atividade de ligação ao ácido desoxirribonucleico (DNA) de factor nuclear kappa B (NF-KB) pós estímulo de lipopolissacarídeos (LPS) em macrófagos de ratos tipo RAW264.7 (PARK et al., 2017). Em ratos submetidos à bulbectomia olfatória o extrato de *C. asiatica* reverteu os sintomas depressivos relacionados ao procedimento de forma semelhante aos antidepressivos imipramina, fluoxetina e desipramina. Além da redução de sintomas tipo depressivos, foi observada uma redução do comportamento tipo ansioso observado no teste do labirinto em cruz elevado (KALSHETTY et al., 2012).

Em um estudo *in vitro* foi observado que os ácidos asiático e madecássico, componentes ativos da espécie, proporcionaram efeitos semelhantes a fatores de crescimento na diferenciação neuronal (LIN; HUANG; HUNG, 2016). Um estudo recente observou que o asiaticosídeo, um componente triterpenoide da *C. asiatica* exerceu efeito tipo antidepressivo em camundongos submetidos a estresse moderado crônico e reduziu a expressão de citocinas inflamatórias (WANG et al., 2020).

O desenvolvimento cerebral demonstra ser um fator determinante para a suscetibilidade ao desenvolvimento de problemas de saúde. Este processo ocorre principalmente na primeira infância. Portanto, diversas situações que ocorrem nesse período da vida podem alterar um desenvolvimento cerebral adequado. Uma hipótese aceita atualmente relaciona experiências negativas com o aumento do risco de desenvolvimento de transtornos mentais, como a depressão. Para investigar essa relação são utilizados modelos animais, pois eles fornecem uma forte relação entre a causa e a consequência (MARCO et al., 2015). Um exemplo de modelo animal utilizado está relacionado com o protocolo de PM, descrito anteriormente como um estressor indutor de TDM (IGNÁCIO et al., 2017b).

O hipocampo faz parte do sistema límbico e está fortemente associado com o processo de formação de novas memórias (TAVARES, 2020). É uma região cerebral onde ocorre a conversão de informações e conexões com outras áreas cerebrais, portanto pode afetar o comportamento e o estado emocional de indivíduos de diferentes formas, sendo influenciado pelo estado emocional e biológico (FRANÇA, 2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa quantitativa de cunho experimental que foi desenvolvida em laboratório com parceria entre a Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e a Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ)

4.1 MATERIAL VEGETAL

Os materiais vegetais de *C. asiatica* foram coletados em Chapecó (SC, Brasil) (27 ° 01 '55.14 'S e 52 ° 47 '29.42' O), em outubro de 2021. A identificação botânica foi feita no Herbário da UNOCHAPECÓ onde uma exsicata foi depositada e tombada sob o número 4930.

4.2 PRODUÇÃO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *C. asiatica*

As amostras de plantas de *C. asiatica* foram secas à temperatura ambiente ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$), trituradas em moinho de facas (Ciemlab®, CE430), selecionadas em peneira (425 μm ; 35 Tyler/Mesch), identificadas e armazenadas com proteção contra a luz. Os extratos foram produzidos através de maceração (5 dias) à temperatura ambiente, utilizando folhas moídas a seco da planta (100 g) e etanol a 70% (1:20, p/ v). Após a filtração através do funil de Büchner, os extratos hidroalcoólicos foram concentrados via evaporação sob pressão reduzida, liofilizados, pesados e armazenados a -20°C .

4.3 ANÁLISES QUÍMICAS DE EXTRATOS DE *C. asiatica*

O extrato de *C. asiatica* foi inicialmente analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando padrões externos para identificação de compostos. Na sequência para identificação inequívoca dos compostos, o extrato foi analisado por Espectrometria de Massa (EM). A infusão direta de fluxo do extrato de *C. asiatica* foi realizada em um analisador Braker SolariX FT-ICR-MS equipado com fonte de ionização por electropulverização (ESI), em modo negativo, taxa de fluxo de gás de secagem 3,0 L/min, temperatura do gás de secagem 200°C , tensão de pulverização de - 0,5 kV, tensão capilar de -

4,5 kV, lente ECD de -10 V, amostra de fluxo de 5 μ l/h e taxa de fluxo de gás nebulizador de 0,4 bar.

As fragmentações (MS/MS) das amostras foram realizadas usando o método de decomposição induzida por colisão (CID) contra argônio para ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para obter dados sobre íons na faixa de m/z 154 - 2000. O segundo evento de varredura foi um experimento de MS/MS que foi realizado usando uma varredura dependente de dados nas moléculas [MH] - dos compostos de interesse a uma taxa de fluxo de gás de colisão de 30%.

4.4 AQUISIÇÃO DO COMPOSTO ATIVO ÁCIDO MADECÁSSICO

O composto foi adquirido na quantidade de 1 grama, através da empresa Interprise Instrumentos Analíticos Ltda, sendo fabricado pela empresa Cayman Chemical, com sede nos Estados Unidos, estado do Michigan. O composto conta com pureza >95%, apresentado em forma sólida cristalina, na quantidade de 1 grama.

4.5 AQUISIÇÃO DO ESCITALOPRAM

O oxalato de escitalopram foi adquirido na quantidade de 1000 gramas, através da Laborsan Farmacia de Manipulacao Ltda, sendo fabricado pela empresa Lepuge Insumos Farmaceuticos Ltda, com sede em São Bernardo do Campo, no estado de São Paulo - Brasil. O composto conta com pureza >95%, apresentado em forma sólida, em pó, na quantidade de 1000 gramas.

4.6 PRIVAÇÃO MATERNA

Os filhotes foram privados da mãe por 3 h/dia nos primeiros 10 dias após o nascimento. A PM consistiu na remoção dos filhotes da gaiola. Os animais não privados (controles) permaneceram imperturbáveis na gaiola original com a mãe. Os animais foram desmamados somente no 21º dia após o nascimento dos filhotes, quando permaneceram em condições padrão. Foram mantidos em 5 animais por caixa, com ciclo claro/escuro de 12

horas (das 07:00 às 19:00 horas, com luz a partir das 7:00 horas), comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

4.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS

Protocolo de PM: A figura 1 expressa um esquema experimental envolvendo o protocolo de PM, tratamentos farmacológicos e testes comportamentais. Os animais foram submetidos ao protocolo de PM nos dez primeiros dias de vida. Quando atingiram 60 dias de vida, os animais foram submetidos a um tratamento crônico de extrato de *C. asiatica* e ácido madecássico por 14 dias. A administração foi feita pelo método de gavagem. Os 60 animais foram divididas em 6 grupos (N = 10 cada grupo): Controle sem estresse + veículo (Controle sem estresse); PM + veículo (Estresse + Tratamento controle); PM + Escitalopram (Estresse + Tratamento controle positivo) 10 mg/kg; PM + Extrato de *C. asiatica* 30 mg/kg; PM + ácido madecássico 10 mg/kg. O controle positivo escitalopram é um antidepressivo clássico da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (PALASZ et al., 2016).

Desenho experimental

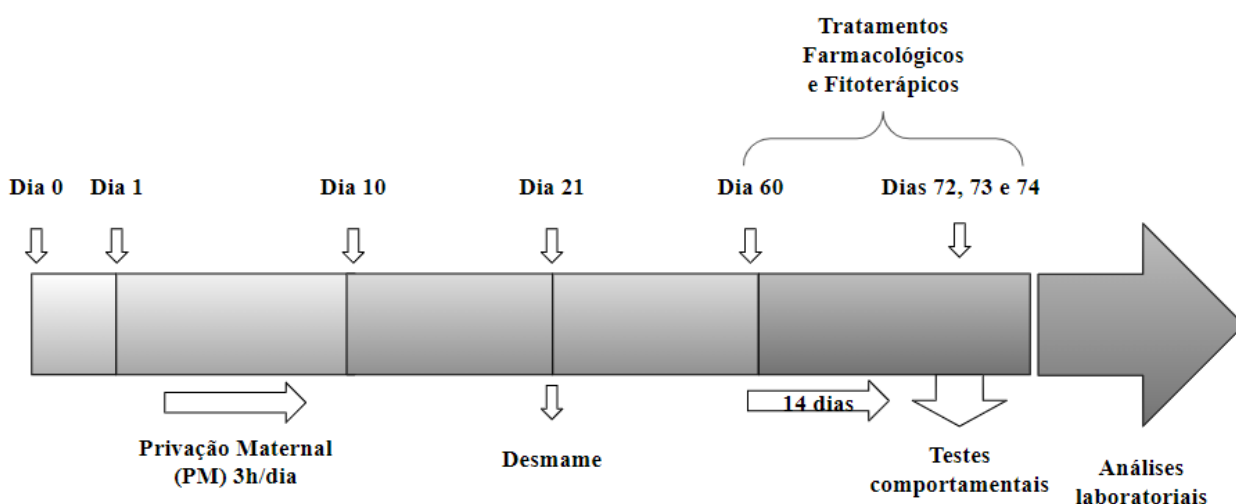


Figura 1 - Desenho experimental do protocolo de PM, tratamentos farmacológicos e testes comportamentais.

4.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram conduzidos durante o período da manhã (8:00 - 12:00) e foram iniciados 60 minutos após cada tratamento. Todos os testes comportamentais foram realizados por um observador cego aos grupos experimentais.

O teste de campo aberto avalia a atividade motora exploratória (RÉUS et al., 2013) (n = 10/grupo). A avaliação da atividade locomotora dos animais foi realizada no campo aberto, uma caixa de 40 x 60 cm, cercada por três paredes de madeira, uma parede frontal de vidro e assoalho dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas. Foi permitido que os animais explorassem o ambiente por 5 minutos, tempo no qual foram contados os cruzamentos entre as linhas pretas e a quantidade de vezes em que o rato ficou apoiado nas patas traseiras a fim de explorar o ambiente (levantamentos).

O teste de natação forçada avalia o comportamento depressivo, conforme descrito anteriormente por Porsolt et al. (2000) (n = 10/grupo). Para realizar o teste, cada rato foi colocado individualmente em um cilindro com água à temperatura de 23°C preenchido com água suficiente para que o animal não consiga apoiar as patas no fundo. Este teste é realizado em dois dias, sendo que no primeiro dia (13^a dia de tratamento farmacológico) os ratos foram forçados a nadar durante 15 minutos (pré-teste), e no segundo dia do teste (14 dia de tratamento farmacológico) os ratos foram forçados a nadar por 5 minutos. Foram avaliados os parâmetros de imobilidade, envolvendo imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar. Também foram avaliados parâmetros de mobilidade, como o tempo que o animal ficou nadando e o tempo que ficou escalando as paredes do cilindro na tentativa de escapar do ambiente. Após o teste de natação, imediatamente os animais foram eutanasiados por decapitação para realizar a coleta das amostras sanguíneas e de tecido cerebral.

4.9 COLETA DE TECIDOS

Após o último teste comportamental (natação forçada), os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação. Após a extração do cérebro, o hipocampo foi separado com base na descrição histológica de Paxinos e Watson (1986). O hipocampo de cada animal foi acondicionado em eppendorf individual e as amostras foram armazenadas em ultra-freezer -80° C para posterior análise dos parâmetros bioquímicos.

4.10 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

Os níveis de IL-1 β e IL-6 no hipocampo foram analisados através de kits ELISA de acordo com os protocolos dos fabricantes dos kits. Para realizar a digestão do hipocampo foi adicionado 1 ml de TRIS HCL 50 mM em cada eppendorf com amostra de hipocampo. Os eppendorfs foram agitados no vortex e mantidos por 2h e 30min em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 3500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado para uso nas análises. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Peterson (Lowry modificado). Tanto a curva quanto as amostras foram analisadas em duplicata (PETERSON, 1977).

Os níveis de IL-1 β e IL-6 foram avaliados pelos kits ELISA da Sigma-Aldrich, Brasil. Os kits apresentavam formato sanduíche com o anticorpo de captura. Foi adicionado 100 μ l de cada padrão e amostra nos poços apropriados, coberto os poços e incubado durante a noite a 4°C com agitação suave. Depois, foi descartada a solução e a placa foi lavada 4 vezes com solução de lavagem 1X (300 μ l por poço). A placa foi invertida e secada contra toalhas de papel limpas. Foi adicionado 100 μ l de anticorpo de detecção preparado 1x a cada poço. Os poços foram cobertos e incubados por 1 hora à temperatura ambiente com agitação suave. Após esta etapa, foi descartada a solução e repetido o procedimento de lavagem. Foi adicionado 100 μ l de solução de Streptavidina preparada em cada poço, que foram cobertos e incubados por 45 minutos à temperatura ambiente com agitação suave. Novamente, a solução foi descartada e foi repetida a lavagem. Foi adicionado 100 μ l de TMB One-Step Substrate Reagent (Item H) a cada poço, que foram cobertos e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro com agitação suave. Por fim, foi adicionado 50 μ l de solução de parada (item I) a cada poço e a placa foi lida com a absorbância de 450 nm imediatamente. Os resultados foram calculados considerando a interpolação da equação da curva da absorbância pela concentração, e estão expressos em picogramas por miligramas (pg/mg) de proteína.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através de ANOVA one-way, seguido do teste post-hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas em um computador, usando o software Statistica 7.0.

4.12 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UNOCHAPECÓ, SC, sob o protocolo 002/CEUA/2021 (Anexo A).

Essa pesquisa utilizou de modelos animais com o objetivo de beneficiar o conhecimento científico (GUIMARAES; FREIRE; MENEZES, 2016). Foi utilizado o número necessário de animais para que não houvesse o sacrifício desnecessário. Os pesquisadores realizaram uma capacitação para entrarem em contato com os ratos, com o objetivo de garantir o menor sofrimento possível e que os dados verificados fossem precisos e fidedignos. Os testes e manipulações realizadas pelos pesquisadores nos roedores já foram testados e utilizados anteriormente, para não ser gerado sofrimento desnecessário (ALMEIDA; NETO; ALMEIDA, 2016).

Caso ocorresse alguma intercorrência ou os níveis de dor, estresse e sofrimento excedam os níveis previstos e tolerados, o critério de suspensão do projeto de pesquisa foi a quebra do protocolo experimental, como em casos de doença inata ou toxicidade observada nos animais. Caso isso ocorresse, seria comunicado a veterinária responsável pelo centro de bioterismo da UNOCHAPECÓ e seria encaminhado o procedimento de eutanásia. Seria utilizado o anestésico pentobarbital sódico na dose de 100 mg/kg por via intraperitoneal para a realização da eutanásia, se necessária, conforme descrito anteriormente (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, 2013).

A decapitação é um método mecânico de eutanásia, com seu uso justificado por não interferir nos resultados bioquímicos necessários na pesquisa e por permitir a retirada de estruturas como o córtex pré-frontal, amígdala, núcleo acumbens e hipocampo sem alterações químicas. Outras formas de eutanásia poderiam comprometer os resultados comportamentais (COMISSÃO DE ÉTICA, BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL/CFMV, 2013).

4.13 DEVOLUTIVA DOS ESTUDOS

Os resultados deste estudo estão sendo organizados para publicação em revista internacional de alto impacto, com o objetivo de que faça parte da literatura científica e sirva de subsídio para outros estudos relacionados à função da *C. asiatica* e seu composto ativo ácido madecássico no TDM relacionado com o estresse no início da vida e os mecanismos fisiológicos implicados nos efeitos terapêuticos.

5. RESULTADOS

5.1 EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO

Os efeitos da PM e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada estão ilustrados na figura 2. No protocolo de natação forçada a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa no tempo de imobilidade, entre os grupos sem estresse e os grupos privados matematicamente e entre os tratamentos ($F=9,4344$; $p < 0,0001$). O teste Post hoc de Tukey revelou as seguintes diferenças estatísticas: A PM elevou significativamente o tempo de imobilidade ($p < 0,002$) no teste de natação forçada e os tratamentos com *C. asiatica* ($p < 0,0007$), ácido madecássico ($p < 0,0002$) e escitalopram ($p < 0,002$) reverteram o efeito da PM. A PM apresentou uma tendência de diminuição do tempo de natação, porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($F=3,15$; $p < 0,024784$). A ANOVA de uma via revelou diferença estatística no tempo de natação no protocolo de natação forçada ($F=3,15$; $p < 0,03$). O teste de Post hoc de Tukey indicou que o grupo PM apresentou menor tempo de natação em comparação ao grupo tratado com ácido madecássico ($p < 0,03$). Quanto à escalada no nado forçado, não houve diferença estatística significativa entre os grupos na avaliação por ANOVA ($F=0,59$; $p > 0,05$).

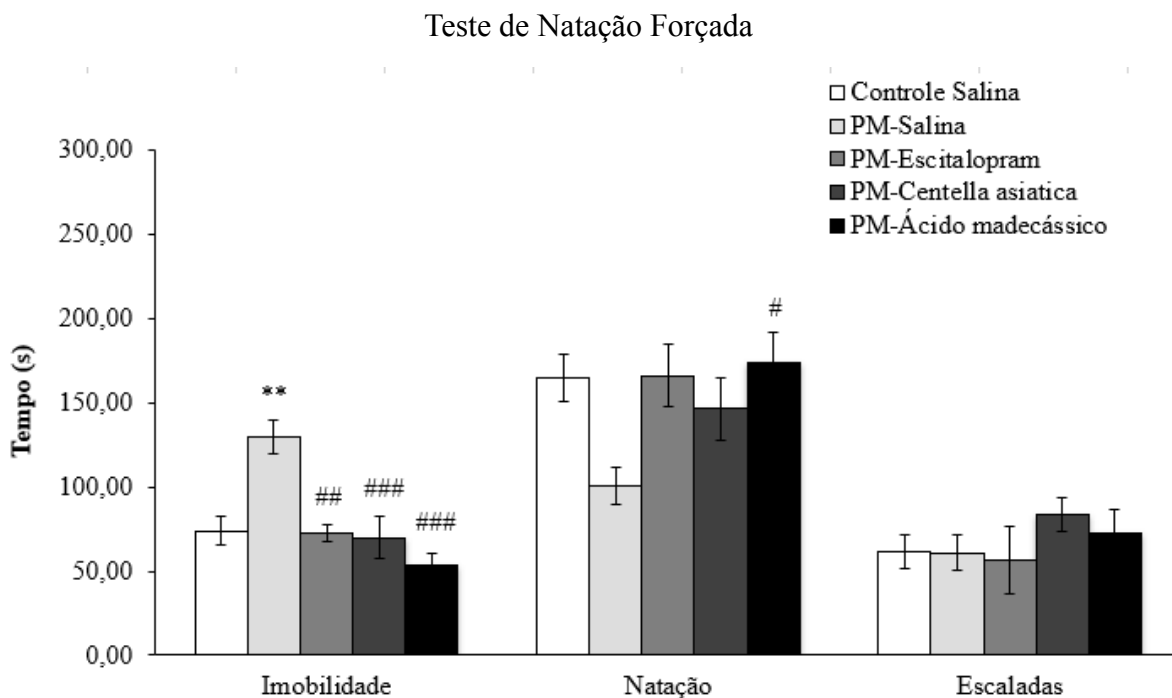


Figura 2 - Efeitos do estresse de PM e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a os parâmetros de mobilidade no teste de natação forçada. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. **diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,01$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$); ##diferente do PM Salina ($p < 0,01$); ###diferente do PM Salina ($p < 0,001$).

5.2 EFEITOS DA PRIVAÇÃO MATERNA E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO

Os efeitos da PM e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto estão ilustrados na figura 3. No teste de campo aberto a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre os grupos sem estresse e os grupos privados maternalmente. Tanto a PM quanto os tratamentos não induziram alterações significativas na atividade locomotora, avaliada através dos números de cruzamentos ($F=1,89$; $p > 0,05$) e levantamentos ($F=1,14$; $p > 0,05$) no teste do campo aberto.

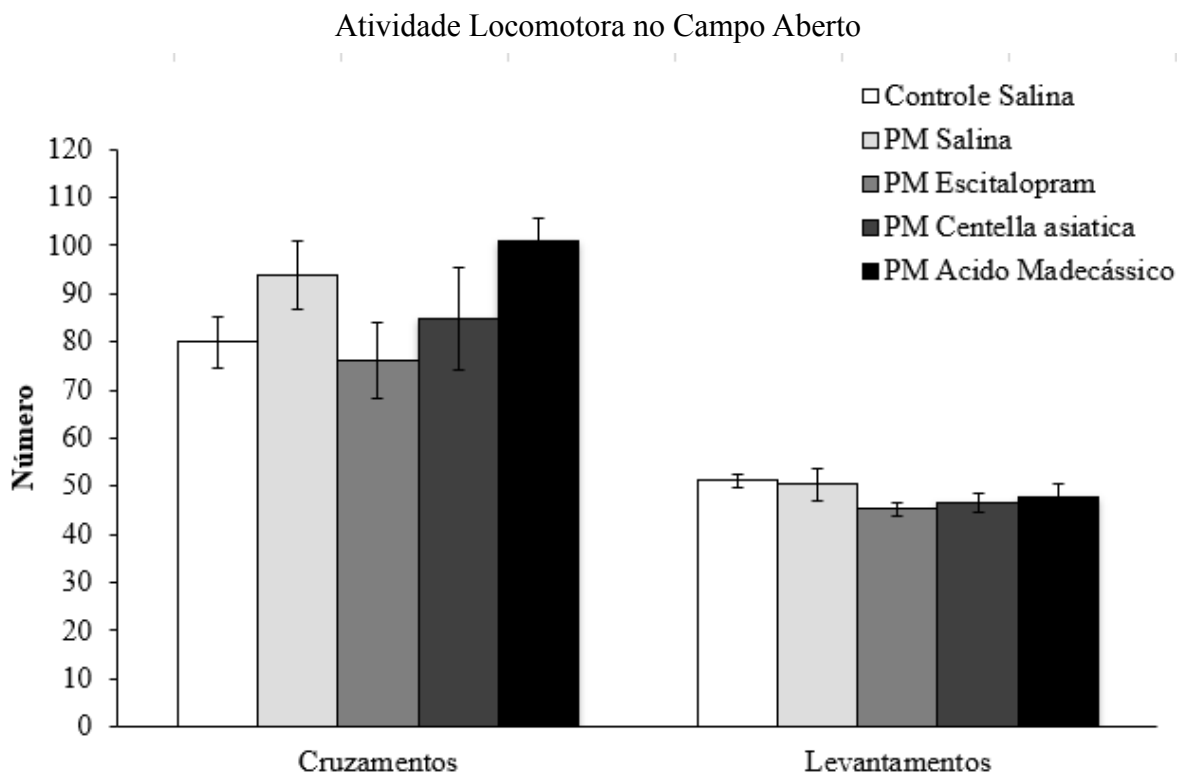


Figura 3 - Efeitos da PM e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5.3 ATIVIDADE DA IL-1 β E IL-6 NO HIPOCAMPO

Os efeitos da PM e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) na atividade da IL-1 β e IL-6 no hipocampo estão ilustrados na figura 4. A ANOVA de uma via revelou uma interação significativa nos níveis de IL-1 β ($F=5,98$ e $p < 0,05$) e IL-6 ($F=6,06$ e $p < 0,01$) entre os grupos.. Quanto ao nível de IL-1 β , o teste Post hoc de Tukey revelou as seguintes diferenças estatísticas: A PM elevou significativamente os níveis de IL-1 β em comparação ao grupo controle ($p < 0,02$) e o tratamento com escitalopram ($p < 0,007$) e ácido madecássico ($p < 0,05$) reverteram o efeito da PM. O tratamento com *C. asiatica* diminuiu os níveis de IL-1 β em comparação ao grupo PM-salina, porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Quanto ao nível de IL-6 o teste Post hoc de Tukey revelou as seguintes diferenças estatísticas: A PM elevou significativamente os níveis de IL-6 em comparação ao grupo controle ($p < 0,009$) e os tratamentos com *C. asiatica* ($p < 0,02$), ácido madecássico ($p < 0,02$) e antidepressivo clássico escitalopram ($p < 0,009$) reverteram o efeito da PM.

Atividade da IL-1 β e IL-6 no Hipocampo

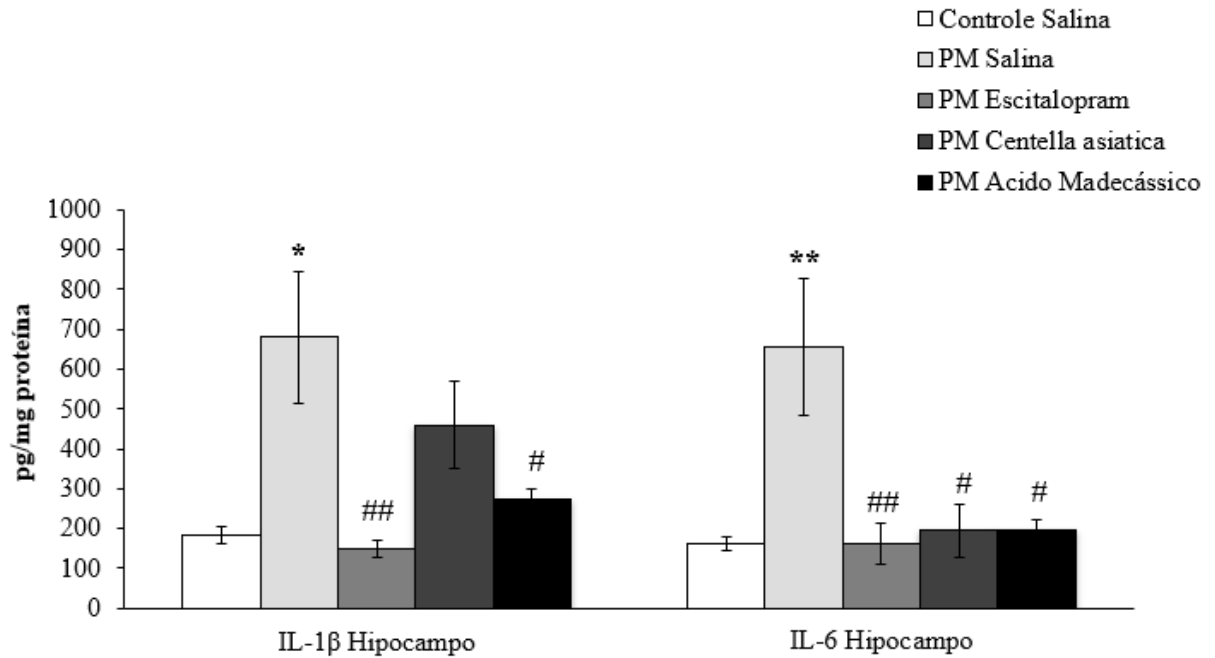


Figura 4 - Efeito da PM e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre os níveis de IL-1 β e IL-6 no hipocampo. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. *diferença estatística entre Controle Salina e PM Salina ($p < 0,05$); **diferença estatística entre Controle Salina e PM Salina ($p < 0,01$); #diferente do PM salina ($p < 0,05$); ##diferente do PM salina ($p < 0,01$); ###diferente do PM salina ($p < 0,001$).

6. DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou o efeito da *C. asiatica*, seu composto ativo ácido madecássico e o escitalopram, antidepressivo clássico, sobre o comportamento tipo depressivo e marcadores inflamatórios no hipocampo de ratos submetidos ao protocolo de PM no início da vida. Como previsto, a PM exerceu efeito tipo depressivo nos animais, corroborando com a literatura científica (IGNÁCIO et al., 2017a; IGNÁCIO et al., 2017b; KHALIFEH et al., 2019; RÉUS et al., 2017; RÉUS et al., 2018), e os tratamentos reverteram os comportamentos tipo depressivos no teste de natação forçada.

A privação maternal em modelos animais mimetiza um estresse crônico no início da vida, como em situações de abandono, abuso e/ou negligência (NISHI, 2020). Pesquisas indicam que o estresse no início da vida aumenta o risco de indivíduos desenvolverem TDM na vida adulta, e os indivíduos que desenvolvem depressão na vida adulta após o estresse crônico no início da vida apresentam maior risco de desenvolver depressão resistente ao tratamento (MARCHETTI et al., 2020). A privação maternal induz comportamentos tipo depressivos e alterações biológicas que contribuem com a fisiopatologia do transtorno, como a neuroinflamação (ELLENBROEK et al., 2016).

O teste de natação forçada avalia comportamentos tipo depressivos, os quais podem ser desencadeados a partir de protocolos animais de estresse crônico, como na privação maternal. É um teste amplamente utilizado para avaliação de substâncias com potencial antidepressivo, considerando que os fármacos antidepressivos clássicos culminam em resposta comportamental tipo antidepressiva em animais submetidos ao protocolo de natação forçada (ARAUCHI et al., 2018; DETKE; LUCKI, 1995; HARAGUCHI et al., 2018).

Quanto aos tratamentos, foi observado que o extrato de *C. asiatica* (30 mg/kg), o ácido madecássico (10 mg/kg) e o escitalopram (10 mg/kg) reduziram os comportamentos tipo depressivos induzidos pelo estresse no início da vida. O escitalopram, um antidepressivo clássico pertencente ao grupo dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina, além de reduzir sintomas de depressão na clínica e comportamentos tipo depressivos em modelos animais é um composto que atua positivamente em vários mecanismos biológicos importantes para a proteção neuronal e na redução da inflamação (MATCHKOV et al., 2015; MUNZER et al., 2013; SEO et al., 2017; WOLKOWITZ et al., 2011). Portanto, a resposta comportamental neste estudo está corroborando outros estudos da literatura científica.

O extrato de *C. asiatica* e o ácido madecássico também reduziram significativamente o tempo de imobilidade. O grupo que apresentou menor imobilidade foi o grupo tratado com ácido madecássico, seguido pelo grupo tratado com o extrato de *C. asiatica*. A imobilidade avaliada no nado forçado é indicativo de comportamento tipo depressivo (FERNANDES; GUPTA, 2019; IGNÁCIO et al., 2017b). É importante destacar que este é o primeiro estudo que observou o efeito tipo antidepressivo desta espécie medicinal utilizando o protocolo de privação maternal e o teste de natação forçada. Portanto, os resultados deste trabalho são inéditos. Entretanto, embora a literatura não tenha resultados com protocolos similares a este trabalho, um estudo recente observou que o asiaticosideo, um componente triterpenoide da *C. asiatica* exerceu efeito tipo antidepressivo em camundongos submetidos a estresse moderado crônico e reduziu a expressão de citocinas inflamatórias (WANG et al., 2020). Outro estudo mais recente traz evidência sobre o efeito antioxidante, anti-envelhecimento e anti-estresse de uma dieta crônica contendo composição de *Centella asiatica* com vitaminas C e D e zinco em um modelo animal com ratos de meia idade (TSOUKALAS et al., 2021). Também, a espécie medicinal foi considerada nesta pesquisa por apresentar um potencial neuroprotetor (LOKANATHAN et al., 2016) e uma pesquisa *in vitro* verificou que o composto ativo ácido madecássico apresenta um forte efeito de potencializar a atividade da telomerase (TSOUKALAS et al., 2019). A enzima telomerase é crucial na prevenção do encurtamento de telômeros e, consequentemente, na inflamação e no envelhecimento e morte celular, os quais também estão envolvidos na fisiopatologia do TDM (LIN; HUANG; HUNG, 2016; SCHRODER et al., 2021; SZE BENI et al., 2014). O estresse crônico vivenciado por indivíduos com TDM culmina em inflamação sistêmica de maneira crônica e, concomitantemente, redução da atividade da telomerase e induz envelhecimento celular (KORDINAS; IOANNIDIS; CHATZIPANAGIOTOU, 2016). A redução do tempo de imobilidade avaliado no teste de nado forçado do grupo tratado com *C. asiatica* e ácido madecássico sugere que esta planta e seu composto ativo apresentam potencial efeito antidepressivo.

Sobre o tempo de natação avaliado no teste de nado forçado foi identificado que o grupo PM apresentou uma diminuição do tempo de nado em comparação ao grupo controle, porém esta diferença não teve significância estatística. O ácido madecássico aumentou significativamente o tempo de natação, quando comparado ao grupo PM salina. O ácido madecássico foi o tratamento que induziu o maior aumento no tempo natação. Pesquisas

indicam que o aumento do tempo de natação e a diminuição do tempo de imobilidade no teste de natação forçada estão relacionados com a ativação do sistema serotoninérgico e aumento do tempo da serotonina na fenda sináptica. O tratamento com antidepressivos clássicos que causam modulação serotoninérgica reduzem o tempo de imobilidade e aumentam o tempo de natação (DETKE et al., 1997; KRÜGEL et al., 2013; PUMPAISALCHAI et al., 2005).

A *C. asiatica* e o ácido madecássico aumentaram o tempo de escalada no teste de nado forçado em comparação com os outros grupos, porém o resultado não teve um nível de significância estatística. Uma pesquisa sugere que o aumento do tempo de escalada está relacionado com ativação do sistema noradrenérgico dos animais (DETKE et al., 1997). Portanto, os efeitos da *C. asiatica* e seu composto ativo ácido madecássico podem estar associados com modulação positiva no sistema noradrenérgico de animais que passaram por protocolo de PM.

As alterações nos parâmetros do teste de natação forçada indicam que o tratamento com *C. asiatica* e o ácido madecássico contribuem positivamente na redução de comportamentos tipo depressivos causados pela PM em roedores, resposta possivelmente mediada pelo efeito neuroprotetor das substâncias fitoterápicas administradas.

Tanto a PM quanto os tratamentos farmacológicos não induziram alterações nos parâmetros de mobilidade do campo aberto. A atividade locomotora avaliada neste teste é um marcador importante do efeito sedativo dos tratamentos (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009), portanto este resultado indica que os fármacos não induziram efeito sedativo importante que poderia interferir nos comportamentos de mobilidade dos animais.

Alterações imunes, como o aumento nos níveis de IL-1 β e IL-6, contribuem com a fisiopatologia do TDM (HOWREN; LAMKIN; SULS, 2009). Outros estudos evidenciaram alterações em mediadores inflamatórias em humanos (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2018; RUDZKI et al., 2019) e animais que passaram por estressores, como o de privação maternal, e apresentaram comportamento tipo depressivo em testes comportamentais (HOWREN; LAMKIN; SULS, 2009; IGNÁCIO et al., 2017b; MAES et al., 1997).

O hipocampo é uma região cerebral potencialmente afetada pela neuroinflamação e está relacionada com a memória, aprendizagem e regulação do feedback negativo ao eixo HPA, o qual interage e interfere nas funções do sistema imune (AMJAD; UMESALMA, 2015; SNYDER et al., 2011; IGNÁCIO et al., 2019). Fármacos com potencial antidepressivo

revertem a desregulação das funções do hipocampo em casos de TDM (PRICE; DREVETS, 2012).

Nesta pesquisa foi observado que a PM elevou significativamente os níveis de IL-1 β em comparação ao grupo controle. Os tratamentos com escitalopram e ácido madecássico reverteram o efeito da PM. O tratamento com *C. asiatica* diminuiu os níveis de IL-1 β em comparação ao grupo PM-salina, porém o resultado não chegou a um nível de significância estatística. De forma similar, a PM elevou significativamente os níveis de IL-6 em comparação ao grupo controle e os tratamentos com escitalopram, *C. asiatica* e ácido madecássico reverteram o efeito da PM.

Pesquisas identificaram que o tratamento crônico com *C. asiatica* induziu redução de radicais livres/peroxidação lipídica desencadeada e contribuiu para manter um nível adequado de enzimas antioxidantes em regiões cerebrais, incluindo o hipocampo, em animais expostos cronicamente ao cloreto de alumínio (AlCl₃). Além disso, o tratamento com o extrato da planta atenuou o aumento de acetilcolinesterase (AChE), contribuindo com a melhora da disfunção do sistema colinérgico e efeito neuroprotetor (AMJAD; UMESALMA, 2015). O ácido madecássico promoveu plasticidade neuronal em células hipocâmpais a partir da indução do alongamento de neuritos e aumento da expressão de canais transitórios rápidos de potássio (SIDDIQUI et al., 2020).

Os animais tratados com escitalopram apresentaram menores níveis de IL-1 β e IL-6 no hipocampo em comparação com os animais que sofreram PM e foram tratados com salina. Estes resultados estão de acordo com a literatura científica, considerando que o tratamento com escitalopram em modelos animais de depressão reverte os sintomas tipo depressivos induzidos pelo modelo e reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, TNF α , e INF- γ (DO PRADO-LIMA et al., 2019).

Os resultados dos níveis de IL-1 β e IL-6 no hipocampo indicam que o ácido madecássico apresenta potencial antiinflamatório e corroboram com a literatura científica. O ácido madecássico aprimora a cognição e a memória, altamente relacionados com o hipocampo (HAMID et al., 2016). Uma pesquisa *in vitro* verificou que o ácido madecássico apresenta potencial antiinflamatório em células de macrófagos RAW 264.7, culminando na redução da expressão de RNAm de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), COX-2, TNF- α , IL-1 β e IL-6 (WON et al., 2010). Uma pesquisa realizada em camundongos diabéticos verificou que a administração de ácido madecássico cronicamente causou redução nos níveis

de IL-1 β e IL-6 nos rins e coração dos animais em comparação com o grupo controle (HSU et al., 2015). Em ratos diabéticos, o tratamento crônico com *C. asiatica* diminuiu os níveis renais de malondialdeído, TNF- α , interferon- γ (IFN- γ) e aumentou os níveis de antioxidantes nos rins e cérebro, indicando que a *C. asiatica* pode proteger os tecidos diabéticos, através de mecanismos antioxidantes e antiinflamatórios (MASOLA; OGUNTIBEJU; OYENIHI, 2018).

Nesta pesquisa não foram verificados parâmetros de estresse oxidativo, porém o efeito antioxidante da planta pode estar relacionado ao efeito anti-inflamatório observado. A literatura científica aponta várias evidências de que o estresse oxidativo está associado positivamente com neuroinflamação e a *C. asiatica* é um potencial terapêutico nestas situações (ARORA et al., 2018; MASOLA; OGUNTIBEJU; OYENIHI, 2018). Análises *in vitro* e *in vivo* indicam que os triterpenos presentes na planta contribuem com a atividade antioxidante, inibitória da colinesterase e efeito antiamnésico da *C. asiatica*, mas não são as únicas substâncias com este efeito no extrato (ARORA et al., 2018).

As terapias antiinflamatórias estão sendo pesquisadas amplamente para tratamento de TDM e outras patologias psiquiátricas (FENG; MCEVOY; MILLER, 2020), e tratamentos não farmacológicos são estratégias terapêuticas para controle da depressão. Um exemplo é a prática regular de exercício físico, que causa resposta comparável à terapias convencionais. A prática de exercícios físicos controla os sintomas depressivos a partir do aumento de substâncias antiinflamatórias e diminuição de substâncias pró-inflamatórias circulantes, controlando a neuroinflamação presente na fisiopatologia do TDM (IGNÁCIO et al., 2019). Uma pesquisa realizada com idosos saudáveis identificou que a ingestão de *C. asiatica* diariamente melhora o desempenho físico e qualidade de vida (MATO et al., 2011).

Os resultados comportamentais e nos marcadores inflamatórios observados no presente estudo assim como os resultados na literatura científica sobre as ações biológicas da espécie *C. asiatica* e seu composto ativo ácido madecássico destacam a importância da continuidade nas análises sobre o perfil antiinflamatório e antidepressivo. Ainda não há estudos na literatura que avaliem o efeito da *C. asiatica* e o ácido madecássico em humanos sobre marcadores inflamatórios. É importante que novas pesquisas sejam realizadas para identificar e elucidar os mecanismos pelo qual a *C. asiatica* e o composto ativo ácido madecássico apresentam potencial antidepressivo e antiinflamatório no modelo animal de privação maternal.

7. CONCLUSÃO

O estresse de privação maternal nos primeiros dias de vida induziu um aumento significativo de comportamentos tipo depressivos na vida adulta. Os animais submetidos ao estresse de PM apresentaram um aumento significativo de citocinas inflamatórias, IL-1 β e IL-6, no hipocampo, sugerindo que o estresse na infância induz neuroinflamação ao longo da vida. Os tratamentos com extrato da *C. asiatica* e composto ativo ácido madecássico, bem como o antidepressivo escitalopram reverteram ou reduziram os comportamentos tipo depressivos e os níveis das citocinas inflamatórias no hipocampo.

Esses resultados sugerem fortemente que a espécie medicinal *C. asiatica* e seu composto ativo apresentam potencial antidepressivo e que a redução da neuroinflamação hipocampal é um mecanismo envolvido no efeito tipo antidepressivo da espécie.

É importante salientar a relevância deste estudo para a área da enfermagem, considerando que a atuação do enfermeiro envolve questões de saúde mental em todas as dimensões de atuação. Com relação ao tema descrito, é possível identificar exemplos de atividades relacionadas com todas as dimensões da enfermagem. Na dimensão assistencial o conhecimento sobre o TDM é de suma importância na atenção primária, secundária e/ou terciária, considerando que os usuários dos serviços de saúde podem apresentar esta demanda. Em relação a dimensão gerencial, é importante ressaltar que a gestão e gerenciamento do cuidado envolve as principais questões de saúde, podendo abranger a saúde mental e indivíduos com TDM. Nas dimensões de ensino, pesquisa e política o tema é igualmente relevante, pois atuar na enfermagem envolve realizar ações de educação em saúde e promoção de saúde com os usuários dos serviços, pesquisar sobre a temática para qualificar o conhecimento e contribuir com a criação de novas políticas públicas de saúde. Todas as dimensões da enfermagem contribuem com a saúde de indivíduos, e a saúde mental precisa ser abrangida.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, I.; NETO, J.; ALMEIDA, T. B.; Princípios Básicos de Pesquisa com Animais de Laboratório. **IFSC**, Sergipe, v. 1, ed. 1, 2016.

AMJAD, S.; UMESALMA S. Protective Effect of *Centella asiatica* against Aluminium-Induced Neurotoxicity in Cerebral Cortex, Striatum, Hypothalamus and Hippocampus of Rat Brain- Histopathological, and Biochemical Approach. **Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis**, v. 06, n. 01, 2015.

ARAUCHI, R.; HASHIOKA, S.; TSUCHIE, K.; MIYAOKA, T.; TSUMORI, T.; LIMO, E.; AZIS, I. A.; OH-NISHI, A.; MIURA, S.; OTSUKI, K.; KANAYAMA, M.; IZUHARA, M.; NAGAHAMA, M.; KAWANO, K.; ARAKI, T.; LIAURY, K.; ABDULLAH, R. A.; WAKE, R.; HAYASHIDA, M.; INOUE, K.; HORIGUCHI, J. Gunn rats with glial activation in the hippocampus show prolonged immobility time in the forced swimming test and tail suspension test. **Brain and Behavior**, v. 8, n. 8, p. e01028, ago. 2018.

ARORA, R.; KUMAR, R.; AGARWAL, A.; REETA, K. H.; GUPTA, Y. K. Comparison of three different extracts of *Centella asiatica* for anti-amnesic, antioxidant and anticholinergic activities: in vitro and in vivo study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1344–1352, set. 2018.

BAKUNINA, N.; PARIANTE, C. M.; ZUNSZAIN, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, n. 3, p. 365–373, mar. 2015.

BARCH, D. M.; TILLMAN, R.; KELLY, D.; WHALEN, D.; GILBERT, K.; LUBY, J. L. Hippocampal volume and depression among young children. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 288, p. 21–28, jun. 2019.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BRASIL. Resolução Normativa Nº 13, De 20 De Setembro De 2013. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**: CONCEA, Brasília, 2013.

CABRERA, Z. C. **Adesão de portadores de depressão ao tratamento**: uma proposta em estratégia saúde da família. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização Estratégia Saúde da Família) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

CHE, Y.; ZHOU, Z.; SHU, Y.; ZHAI, C.; ZHU, Y.; GONG, S.; CUI, Y.; WANG, J-F. Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 208–213, jan. 2015.

COMISSÃO DE ÉTICA, BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL/CFMV. 29 de janeiro de 2012. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais: Conceitos e Procedimentos**, [S. l.], 12 jan. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353513/>. Acesso em: 14 abr. 2021.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J. C.; FREUND, G. G.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46–56, jan. 2008.

DASKALAKIS, N. P.; BAGOT, R. C.; PARKER, K. J.; VINKERS, C. H.; DE KLOET, E. R. The three-hit concept of vulnerability and resilience: Toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1858–1873, set. 2013.

DETKE, M. J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioural Brain Research**, v. 73, n. 1–2, p. 43–46, dez. 1995.

DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 107–112, 1997.

DINAN, T. G. Inflammatory markers in depression. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 22, n. 1, p. 32–36, jan. 2009.

DO PRADO-LIMA, P. A. S.; ONSTEN, G. A.; DE OLIVEIRA, G. N.; BRITO, G. C.; GHILARDI, I. M.; DE SOUZA, E. V.; DOS SANTOS, P. G.; SALAMONI, S. D.; MACHADO, D. C.; DUARTE, M. M. F.; BARBISAN, F.; DA CRUZ, I. B. M.; COSTA-FERRO, Z. S. M.; DA COSTA, J. C. The antidepressant effect of bone marrow mononuclear cell transplantation in chronic stress. **Journal of Psychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 632–639, 25 maio 2019.

DOWLATI, Y.; HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, E. K.; LANCTÔT, K. L. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, mar. 2010.

DUTRA, A. Benefícios da *Centella asiatica*. **Revista Alainura**, 2019.

EKEANYANWU, R. C.; NJOKU, O. U. Flavonoid-rich fraction of the *MonoMonodora tenuifolia* seed extract attenuates behavioural alterations and oxidative damage in forced-swim stressed rats. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 3, p. 183–191, mar. 2015.

ELLENBROEK, B. A.; ANGELUCCI, F.; HUSUM, H.; MATHE, A. A. Gene-environment interactions in a rat model of depression. Maternal separation affects neurotensin in selected brain regions. **Neuropeptides**, v. 59, p. 83–88, out. 2016.

FENG, T.; MCEVOY, J. P.; MILLER, B. J. Longitudinal study of inflammatory markers and psychopathology in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 224, p. 58–66, out. 2020.

FERNANDES, J.; GUPTA, G. L. N-acetylcysteine attenuates neuroinflammation associated depressive behavior induced by chronic unpredictable mild stress in rat. **Behavioural Brain Research**, v. 364, p. 356–365, maio 2019.

FRANÇA, T. F. A. **Plasticidade, topografia e alocação de memórias: uma investigação teórica sobre o código neural no hipocampo**. Tese. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 190p. 2020. Disponível em: <http://200.19.254.174/bitstream/handle/1/8262/tese%20Thiago%20F.%20A.%20Fran%c3%a7a.pdf?sequence=1> Acesso em 18 mar. 2022

FREY, A.-L.; MCCABE, C. Effects of serotonin and dopamine depletion on neural prediction computations during social learning. **Neuropsychopharmacology**, v. 45, n. 9, p. 1431–1437, 24 ago. 2020.

GARABADU, D.; AHMAD, A.; KRISHNAMURTHY, S. Risperidone Attenuates Modified Stress–Re-stress Paradigm-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Rats Exhibiting Post-traumatic Stress Disorder-Like Symptoms. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 56, n. 2, p. 299–312, 7 jun. 2015.

GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The Open Field Test. In T. D. Gould (Ed.), *Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests*. **Humana Press**. p. 1–20, 2009.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. C.; MENEZES, L. M. B. Utilização de animais em pesquisa: Breve revisão da legislação. **Rev. Bioética**, Fortaleza, 2016.

HAMID, K.; NG, I.; TALLAPRAGADA, V. J.; VÁRADI, L.; HIBBS, D. E.; HANRAHAN, J.; GROUNDWATER, P. W. An Investigation of the Differential Effects of Ursane Triterpenoids from *Centella asiatica*, and Their Semisynthetic Analogues, on GABA A Receptors. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 88, n. 3, p. 386–397, set. 2016.

HARAGUCHI, A.; FUKUZAWA, M.; IWAMI, S.; NISHIMURA, Y.; MOTOHASHI, H.; TAHARA, Y.; SHIBATA, S. Night eating model shows time-specific depression-like behavior in the forced swimming test. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1081, 18 dez. 2018.

HOWREN, M. B.; LAMKIN, D. M.; SULS, J. Associations of Depression With C-Reactive Protein, IL-1, and IL-6: A Meta-Analysis. **Psychosomatic Medicine**, v. 71, n. 2, p. 171–186, fev. 2009.

HSU, Y.-M.; HUNG, Y.; HU, L.; LEE, Y.; YIN, M. Anti-Diabetic Effects of Madecassic Acid and Rotundic Acid. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 10065–10075, 2 dez. 2015.

IGNÁCIO, Z.M.; RÉUS, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; QUEVEDO, J. Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: insights in depression. **Neuroscience**, v. 275, p. 455-468, 2014.

IGNÁCIO, Z.M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J.; KALINICHEV, M.; FRANCIS, D. Maternal Deprivation. In: Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. **Elsevier**, 2017a.

IGNÁCIO, Z. M.; RÉUS, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; MACIEL, A. L.; DE MOURA, A. B.; MATOS, D.; DEMO, J. P.; DA SILVA, J. B.; GAVA, F. F.; VALVASSORI, S. S.; CARVALHO, A. F.; QUEVEDO, J. Quetiapine treatment reverses depressive-like behavior and reduces DNA methyltransferase activity induced by maternal deprivation. **Behav Brain Res.**, 2017b.

IGNÁCIO, Z. M.; DA SILVA, R. S.; PLISSARI, M. E.; QUEVEDO, J.; RÉUS, G. Z. Physical Exercise and Neuroinflammation in Major Depressive Disorder. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 12, p. 8323–8335, 21 dez. 2019.

JANA, U.; SUR, T. K.; MAITY, L. N.; DEBNATH, P. K.; BHATTACHARYYA, D. A clinical study on the management of generalized anxiety disorder with *Centella asiatica*. **Nepal Med Coll J.**, v. 12, p. 8-11, 2010.

JOU, S.-H.; CHIU, N.-Y.; LIU, C.-S. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. **Chang Gung medical journal**, v. 32, n. 4, p. 370–9.

KALSHETTY, P.; ASWAR, U.; BODHANKAR, S.; SINNATHAMBI, A.; MOHAN, V.; THAKURDESAI, P. Antidepressant effects of standardized extract of *Centella asiatica* L in olfactory bulbectomy model. **Biomedicine & Aging Pathology**, p. 48–53, 2012.

KATZ, M. M.; MAAS, JAMES W.; FRAZER, A.; KOSLOW, S. H.; BOWDEN, C. L.; BERMAN, N.; SWANN, A. C.; STOKES, P. E. Drug-Induced Actions on Brain Neurotransmitter Systems and Changes in the Behaviors and Emotions of Depressed Patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 2, p. 89–100, out. 1994.

KELLER, M. B.; LAVORI, P. W.; MUELLER, T. I.; ENDICOTT, J.; CORYELL, W.; HIRSCHFELD, R. M.; SHEA, T. Time to recovery, chronicity and levels of psychopathology in major depression: A 5-year prospective follow up of 431 subjects. **Arch Gen Psychiatry**, p. 809-881, 1992.

KHALIFEH, S.; KHODAGHOLI, F.; MOGHATAE, M.; BEHVARMANESH, A.; KHERADMAND, A.; GHAZVINI, H. Effects of Maternal Deprivation on Anxiety, Depression, and Empathy in Male and Female Offspring of Wistar Rats in the Face of Novel Objects. **Galen Medical Journal**, v. 8, p. 1093, 1 jan. 2019.

KORDINAS, V.; IOANNIDIS, A.; CHATZIPANAGIOTOU, S. The Telomere/Telomerase System in Chronic Inflammatory Diseases. Cause or Effect? **Genes**, v. 7, n. 9, p. 60, 3 set. 2016.

KRÜGEL, U.; FISCHER, J.; RADICKE, S.; SACK, U.; HIMMERICH, H. Antidepressant effects of TNF- α blockade in an animal model of depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 5, p. 611–616, maio 2013.

LARSEN, M. H.; MIKKELSEN, J. D.; HAY-SCHMIDT, A.; SANDI, C. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and

the effects of chronic antidepressant treatment. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 13, p. 808–816, out. 2010.

LIN, P. Y.; HUANG, Y. C.; HUNG, C. F. Shortened telomere length in patients with depression: A meta-analytic study. **J Psychiatr Res.**, v. 76, p. 84–93, 2016.

LOKANATHAN, Y.; OMAR, N.; AHMAD PUZI, N. N.; SAIM, A.; HJ IDRUS, R. Recent Updates in Neuroprotective and Neuroregenerative Potential of *Centella asiatica*. **Malays J Med Sci.**, v. 23, p. 4-14, 2016.

MAES, M.; BOSMANS, E.; DE JONGH, R.; KENIS, G.; VANDOOOLAEGHE, E.; NEELS, H. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. **Cytokine**, v. 9, n. 11, p. 853–858, nov. 1997.

MARCHETTI, L.; LAURIA, M.; CABERLOTTO, L.; MUSAZZI, L.; POPOLI, M.; MATHÉ, A. A. DOMENICI, E.; CARBONI, L. Gene expression signature of antidepressant treatment response/non-response in Flinders Sensitive Line rats subjected to maternal separation. **European Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 69–85, fev. 2020.

MARCO, E. M.; LLORENTE, R.; LOPEZ-GALLARDO, M.; MELA, V.; LLORENTE-BERZAL, A.; PRADA, C.; VIVEROS, M. P. The Maternal Deprivation animal model revisited. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2015.

MASOLA, B.; OGUNTIBEJU, O. O.; OYENIHI, A. B. *Centella asiatica* ameliorates diabetes-induced stress in rat tissues via influences on antioxidants and inflammatory cytokines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 447–457, maio 2018.

MATCHKOV, V. V.; KRAVTSOVA, V. V.; WIBORG, O.; AALKJAER, C.; BOUZINOVA, E. V. Chronic selective serotonin reuptake inhibition modulates endothelial dysfunction and oxidative state in rat chronic mild stress model of depression. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 8, p. R814–R823, 15 out. 2015.

MATO, L.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S.; TONGUN, T.; PIYAWATKUL, N.; YIMTAE, K.; THANAWIRATTANANIT, P.; SRIPANIDKULCHAI, B. *Centella asiatica* Improves Physical Performance and Health-Related Quality of Life in Healthy Elderly Volunteer. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

MOKOENA, M. L.; HARVEY, B. H.; VILJOEN, F.; ELLIS, S. M.; BRINK, C. B. Ozone exposure of Flinders Sensitive Line rats is a rodent translational model of neurobiological oxidative stress with relevance for depression and antidepressant response. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 16, p. 2921–2938, 17 ago. 2015.

MUELLER, T.I.; LEON, A. C.; KELLER, M. B.; SOLOMON, D. A.; ENDICOTT, J.; CORYELL, W.; WARSHAW, M.; MASER, J. D. Recurrence after recovery from major depressive disorder during 15 years of observational follow-up. **Am J Psychiatry**, p.1000-1006, 1999.

MUNZER, A.; SACK, U.; MERGL, R.; SCHÖNHERR, J.; PETERSEIN, C.; BARTSCH, S.; KIRKBY, K.; BAUER, K.; HIMMERICH, H. Impact of Antidepressants on Cytokine Production of Depressed Patients in Vitro. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2227–2240, 19 nov. 2013.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci**, v. 5, p. 1068-1070, 2002.

NEVES, A. L. A. Tratamento farmacológico da depressão. **Revista da faculdade de ciências da saúde**, Porto, 2015.

NISHI, M. Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7212, 29 set. 2020.

ORTMANN, C. F.; REUS, G. Z.; IGNACIO, Z. M.; ABELAIRA, H. M.; TITUS, S. E.; CARVALHO, P.; ARENT, C. O.; SANTOS, M. A. B.; MATIAS, B.; MARTINS, M. M.; CAMPOS, M. A.; PETRONILHO F.; TEIXEIRA, T. J.; MORAIS, M. O. S.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F. H.; Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trecul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. **Neurotox Res.**, 2016.

PALASZ, A.; SUSZKA-ŚWITEK, A.; FILIPCZYK, L.; BOGUS, K.; ROJCZYK, E.; WORTHINGTON, J.; KRZYSTANEK, M.; WIADERKIEWICZ, R. Escitalopram affects spexin expression in the rat hypothalamus, hippocampus and striatum. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1326–1331, dez. 2016.

PARK, J.H.; CHOI, J.Y.; SON, D.J.; PARK, E.K.; SONG, M.J.; HELLSTROM, M. Anti-Inflammatory Effect of Titrated Extract of *Centella asiatica* in Phthalic Anhydride-Induced Allergic Dermatitis Animal Model. **Int J Mol Sci.**, 2017.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, 1986.

PÉREZ-SÁNCHEZ, G.; BECERRIL-VILLANUEVA, E.; ARREOLA, R.; MARTÍNEZ-LEVY, G.; HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, M. E.; VELASCO-VELÁSQUEZ, M. A.; ALVAREZ-HERRERA, S.; CRUZ-FUENTES, C.; PALACIOS, L.; DE LA PEÑA, F.; PAVÓN, L. Inflammatory Profiles in Depressed Adolescents Treated with Fluoxetine: An 8-Week Follow-up Open Study. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–12, 18 dez. 2018.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346–356, dez. 1977.

PORSOLT, R. D.; Animals Models of Depression: Utility for Transgenic Research. **Reviews in the Neurosciences**, 2000.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 1, p. 61–71, jan. 2012.

PUMPAISALCHAI, W.; KAEWICHIT, S.; TAESOTHIKUL, T.; NIWATANANUN, W.; SANICHWANKUL, K. The Antidepressive Effect of Barakol in the Forced-Swimming Test. **CMU Journal**, v. 4, n. 2, 2005.

RAWDIN, B. J.; MELLON, S. H.; DHABHAR, F. S.; EPEL, E. S.; PUTERMAN, E.; SU, Y.; BURKE, H. M.; REUS, V. I.; ROSSER, R. HAMILTON, S. P.; NELSON, J. C.; WOLKOWITZ, O. M. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 31, p. 143–152, jul. 2013.

REUS, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; SANTOS, M. A. B.; CARLESSI, A. S.; TOMAZ, D. B.; NEOTTIA, M. V.; LIRANC, J. L. G.; GUBERT, C.; BARTH, M.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Ketamine and imipramine in the 48 nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. **Behav Brain Res.**, v. 256, p. 451–456, 2013.

RÉUS, G. Z.; CARLESSI, A. S.; TITUS, S. E.; ABELAIRA, H. M.; IGNÁCIO, Z. M.; DA LUZ, J. R.; MATIAS, B. I.; BRUCHCHEN, L.; FLORENTINO, D.; VIEIRA, A.; PETRONILHO, F.; QUEVEDO, J. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. **Dev Neurobiol.**, v. 75, n. 11, p. 1268–81, 2015.

RÉUS, G. Z.; FERNANDES, G. C.; DE MOURA, A. B.; SILVA, R. H.; DARABAS, A. C.; DE SOUZA, T. G.; ABELAIRA, H. M.; CARNEIRO, C.; WENDHAUSEN, D.; MICHELS, M.; PESCADOR, B.; DAL-PIZZOL, F.; MACÊDO, D. S.; QUEVEDO, J. Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 95, p. 196–207, dez. 2017.

RÉUS, G. Z.; SILVA, R. H.; DE MOURA, A. B.; PRESA, J. F.; ABELAIRA, H. M.; ABATTI, M.; VIEIRA, A.; PESCADOR, B.; MICHELS, M.; IGNÁCIO, Z. M.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Early Maternal Deprivation Induces Microglial Activation, Alters Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity and Indoleamine 2,3-Dioxygenase during the Development of Offspring Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 1096–1108, 5 fev. 2019.

RUDZKI, L.; OSTROWSKA, L.; PAWLAK, D.; MALUS, A.; PAWLAK, K.; WASZKIEWICZ, N.; SZULC, A. Probiotic *Lactobacillus Plantarum* 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 100, p. 213–222, fev. 2019.

SCHRODER, J. D.; DE ARAÚJO, J. B.; DE OLIVEIRA, T.; DE MOURA, A. B.; FRIES, G. R.; QUEVEDO, J.; RÉUS, G. Z.; IGNÁCIO, Z. M. Telomeres: the role of shortening and senescence in major depressive disorder and its therapeutic implications. **Reviews in the Neurosciences**, 13 ago. 2021.

SEO, M. K.; CHOI, C. M.; MCINTYRE, R. S.; CHO, H. Y.; LEE, C. H.; MANSUR, R. B.; LEE, Y.; LEE, J.; KIM, Y. H.; PARK, S. W.; LEE, J. G. Effects of escitalopram and

paroxetine on mTORC1 signaling in the rat hippocampus under chronic restraint stress. **BMC Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 39, 26 dez. 2017.

SHAHZAD, N.; AHMAD, J.; KHAN, W.; AL-GHAMDI, S. S.; AIN, M. R.; IBRAHIM, I. A. A.; AKHTAR, M.; KHANAM, R.; Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 79–84, fev. 2014.

SIDDIQUI, S.; KHAN, F.; JAMALI, K. S.; MUSHARRAF, S. G. Madecassic Acid Reduces Fast Transient Potassium Channels and Promotes Neurite Elongation in Hippocampal CA1 Neurons. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 19, n. 1, p. 12–26, 27 abr. 2020.

SNYDER, J. S.; SOUMIER, A.; BREWER, M.; PICKEL, J.; CAMERON, H. A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 458–461, 3 ago. 2011.

SOUZA, M. S. F.; KOPITTK, L. Adesão ao tratamento com psicofármacos: fatores de proteção e motivos de não adesão ao tratamento farmacológico. **Revista APS**, 2016.

SOUZA, M. M. R.; GODINHO, L. R. L. C. Atuação do *Hypericum perforatum* no tratamento da depressão. **Revista Terra e Cultura**, p. 51-65, 11 dez. 2020.

SONG, Z.; SHEN, F.; ZHANG, Z.; WU, S.; ZHU, G. Calpain inhibition ameliorates depression-like behaviors by reducing inflammation and promoting synaptic protein expression in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 174, p. 108175, set. 2020.

STRECK, E. L.; GONÇALVES, C. L.; FURLANETTO, C. B.; SCAINI, G.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Mitochondria and the central nervous system: searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 36, n. 2, p. 156–167, 15 abr. 2014.

SZEBENI, A.; SZEBENI, K.; DIPERI, T.; CHANDLEY, M. J.; CRAWFORD, J. D.; STOCKMEIER, C. A.; ORDWAY, G. A. Shortened telomere length in white matter oligodendrocytes in major depression: potential role of oxidative stress. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 10, p. 1579–1589, 26 out. 2014.

TAVARES, L. C. S. **Interações hipocampo-prefrontais durante a tomada de decisão espacial**. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Bioinformática. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 52p. 2020. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/28962/1/Interacoeshipocampoprefrontais_Tavares_2020.pdf Acesso em 18 mar. 2022.

TEN HAVE, M.; DE GRAAF, R. VAN DORSSELAER, S. TUITHOF, M. KLEINJAN, M. PENNINX, B. W. J. H. Recurrence and chronicity of major depressive disorder and their risk indicators in a population cohort. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 137, n. 6, p. 503–515, jun. 2018.

TSOUKALAS, D.; FRAGKIADAKI, P.; DOCEA, A. O.; ALEGAKIS, A. K.; SARANDI, E.; THANASOULA, M.; SPANDIDOS, D. A.; TSATSAKIS, A.; RAZGONOVA, M. P.;

CALINA, D. Discovery of potent telomerase activators: Unfolding new therapeutic and anti-aging perspectives. **Molecular Medicine reports**, p. 3701-3708, 2019.

TSOUKALAS, D.; ZLATIAN, O.; MITROI, M.; RENIERI, E.; TSATSAKIS, A.; IZOTOV, B. N.; BURADA, F.; SOSOI, S.; BURADA, E.; BUGA, A. M.; ROGOVEANU, I.; DOCEA, A. O.; CALINA, D. A Novel Nutraceutical Formulation Can Improve Motor Activity and Decrease the Stress Level in a Murine Model of Middle-Age Animals. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 4, p. 624, 6 fev. 2021.

WANG, L.; GUO, T.; GUO, Y.; XU, Y. Asiaticoside produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice, involving reversion of inflammation and the PKA/pCREB/BDNF signaling pathway. **Mol Med Rep.**, v. 22, n. 3, p. 2364-2372, 2020.

WILLIAMS, L. M.; DEBATTISTA, C.; DUCHEMIN, A. M.; SCHATZBERG, A. F.; NEMEROFF, C. B. Childhood trauma predicts antidepressant response in adults with major depression: data from the randomized international study to predict optimized treatment for depression. **Transl Psychiatry**, p.799, 2016.

WOLKOWITZ, O. M.; WOLF, J.; SHELLY, W.; ROSSER, R.; BURKE, H. M.; LERNER, G. K.; REUS, V. I.; NELSON, J. C. EPEL, E.S.; MELLON, S. H. Serum BDNF levels before treatment predict SSRI response in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1623–1630, ago. 2011.

WON, J.-H.; SHIN, J.; PARK, H.; JUNG, H.; KOH, D.; JO, B.; LEE, J.; YUN, K.; LEE, K. Anti-inflammatory Effects of Madecassic Acid via the Suppression of NF- κ B Pathway in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophage Cells. **Planta Medica**, v. 76, n. 03, p. 251–257, 11 fev. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental health of older adults**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/mental-health-of-older-adults>. Acesso em: 11 mar. 2021.

XU, Y.; SHENG, H.; TANG, Z.; LU, J.; NI, X. Inflammation and increased IDO in hippocampus contribute to depression-like behavior induced by estrogen deficiency. **Behavioral Brain Research**, v. 288, p. 71–78, jul. 2015.

ZHANG, Y.; WANG, Y.; WANG, L.; BAI, M.; ZHANG, X.; ZHU, X. Dopamine Receptor D2 and Associated microRNAs Are Involved in Stress Susceptibility and Resistance to Escitalopram Treatment. **Int J Neuropsychopharmacol**, 2015.

ZHAO, Y.; SHU, P.; ZHANG, Y.; LIN, L.; ZHOU, H.; XU, Z.; SUO, D.; XIE, A.; JIN, X. Effect of *Centella asiatica* on Oxidative Stress and Lipid Metabolism in Hyperlipidemic Animal Models. **Oxid Med Cell Longev.**, 2014.

ZHOU, Q.-G.; HU, Y.; HUA, Y.; HU, M.; LUO, C.-X.; HAN, X.; ZHU, X.-J.; WANG, B.; XU, J.-S.; ZHU, D.-Y. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 5, p. 1843–1854, dez. 2007.

ANEXO A - Carta de aprovação da pesquisa pelo CEUA da UNOCHAPECÓ

UNIVERSIDADE COMUNITÁRIA DA REGIÃO DE CHAPECÓ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “Efeito de Extrato e Composto Ativo da *Centella asiatica* em Comportamento Tipo Depressivo e Atividade da Telomerase em Ratos submetidos a Estresse de Privação Maternal”, protocolo nº 002/CEUA/2021, sob a responsabilidade de Walter Antônio Roman Junior, que envolve a produção/ manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrada (exceto homem), para fins de ensino e pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de oito de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), em 28/04/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/07/2021 à 01/09/2022
Espécie/Linhagem/Raça	Espécie: <i>Rattus norvegicus</i> ; Albinos; Linhagem Wistar; Nome vulgar: Rato
Nº de animais	60
Peso/Idade	4 a 500g, de acordo com a idade, 0 a 95 dias
Sexo	Machos.
Origem	Biotério da Universidade Comunitária da Região de Chapecó.

Lilian C. Bohnen

Prof.^a Lilian Caroline Bohnen
Coordenadora da CEUA