

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
CURSO DE MEDICINA**

EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DA ESPÉCIE *Aloysia citriodora* EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNAL NA INFÂNCIA

**SEVERINA SILVA AMARAL
SILVIO JOSÉ BATISTA SOARES**

**CHAPECÓ
2022**

**SEVERINA SILVA AMARAL
SILVIO JOSÉ BATISTA SOARES**

EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DA ESPÉCIE *Aloysia citriodora* EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNAL NA INFÂNCIA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Médico(a).

Orientador: Prof^a Dr^a Zuleide Maria Ignácio

**CHAPECÓ
2022**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

, Severina Silva Amaral; Silvio José Batista Soares
Efeito antidepressivo e antiinflamatório da espécie
Aloysia citriodora em ratos adultos submetidos à
privação maternal na infância / Severina Silva Amaral;
Silvio José Batista Soares . -- 2022.
f.:il.

Orientadora: Dra. Zuleide Maria Ignácio

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

1. Transtorno Depressivo Maior. 2. Privação Maternal.
3. Neuroinflamação. 4. Aloysia citriodora. I. , Zuleide
Maria Ignácio, 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).



Severina Silva Amaral

Acadêmica



Silvio José Batista Soares

acadêmico

EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DA ESPÉCIE *ALOYSIA citriodora* EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNAL NA INFÂNCIA”

Trabalho de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de aprovação no respectivo componente da grade do curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul - *campus* Chapecó.

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Zuleide Maria Ignácio**

Este trabalho de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 01/09/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a MSc. Lilian Caroline Bohnen



Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini

RESUMO

Uma extensa literatura descreve observações e teorias à causa e terapêutica dos transtornos psiquiátricos, entre eles, o Transtorno Depressivo Maior (TDM), cujas causas são multifatoriais. É um transtorno bastante incapacitante e considerado um problema de saúde pública de grande impacto psicossocial que repercute na saúde geral. Inúmeras pesquisas demonstram que um dos maiores fatores responsáveis pelo TDM é o estresse no início da vida, acarretando em prejuízos ao desenvolvimento cerebral e disfunções biológicas, tanto neurais quanto sistêmicas. Estudos evidenciam que uma parcela significativa dos pacientes deprimidos apresenta sintomas resistentes aos antidepressivos clássicos. Além disso, a resposta terapêutica às diversas estratégias farmacológicas necessita de um tempo longo de tratamento. Deste modo, estudos incluindo plantas medicinais, são cada vez mais frequentes como potenciais estratégias terapêuticas na fisiopatologia da Depressão Resistente a Tratamentos (DRT). Portanto, o objetivo desta proposta foi avaliar o tratamento com extrato hidroalcoólico da espécie medicinal *Aloysia citriodora* em comportamentos tipo depressivos e parâmetros de neuroinflamação em ratos adultos submetidos a estresse de Privação Maternal (PM) nos primeiros dias de vida. Após um dia de vida, os filhotes foram submetidos a um protocolo de PM por 3 horas diárias, durante dez dias. Com sessenta dias de vida, os animais foram submetidos a um tratamento crônico durante quatorze dias com o extrato da planta e no final do tratamento foi realizado o teste de natação forçada e eutanásia dos animais para coleta das amostras biológicas. O protocolo de PM culminou em um aumento significativo dos comportamentos depressivos na vida adulta, além de promover um aumento na expressão de citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo. O tratamento com o extrato de *A. citriodora* reverteu os comportamentos depressivos de forma similar ao grupo tratado com escitalopram. Além disso, observou-se que o grupo submetido ao tratamento com o extrato da planta foi o que apresentou a menor expressão de citocinas inflamatórias. Dessa forma, substâncias provenientes da *A. citriodora* podem ser uma estratégia promissora na terapêutica do TDM.

Palavras-chave: Transtorno depressivo maior; privação maternal; *Aloysia citriodora*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho Experimental	23
Figura 2 - Teste de Natação Forçada	27
Figura 3 - Atividade Locomotora no Campo Aberto	28
Figura 4 - Atividade da IL-1 β e IL-6 no Hipocampo	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. citriodora</i>	<i>Aloysia citriodora</i>
ACTH	Hormônio Adenocorticotrófico
ANOVA	Análise de Variância
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alto Eficiência
CLC	Cromatografia Líquida em Coluna
CPF	Córtex Pré Frontal
CBI	Centro de Bioterismo
CIUCA	Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DRT	Depressão Resistente ao Tratamento
Esc	Escitalopram
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
EHA	Extrato Hidroalcoólico
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
IDO	Indoleamina 2,3 Dioxigenase
IL	Interleucina
ISRSs	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
mTOR	Alvo da Rapamicina em Mamíferos
mm	Milímetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PM	Privação maternal
SE	Sem estresse
TNF	Teste de Natação Forçada
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF	Teste de Natação Forçada
TCA	Teste de Campo Aberto
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UNOCHAPECÓ	Universidade Comunitária da Região de Chapecó

UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV/Vis	Ultravioleta e Visível
μl	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 ASPECTOS GERAIS DA <i>A. citriodora</i>	12
1.2 USOS GERAIS DA <i>A. citriodora</i>	13
1.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA <i>A. citriodora</i>	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E SOLVENTES	15
2.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS.....	15
2.3 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PREPARAÇÃO DOS VEGETAIS	16
2.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO	16
2.5 ANÁLISE QUÍMICA.....	17
2.5.1 Estimativa total do teor de flavonoides	17
2.5.2 Quantificação de fenóis totais	17
2.6 ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DO EHA	17
2.7 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO QUÍMICO	18
2.8 AQUISIÇÃO DO COMPOSTO OXALATO DE ESCITALOPRAM	18
2.9 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS	19
2.9.1 Protocolo de separação maternal	19
2.9.2 Testes comportamentais	20
2.10 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS	21
2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
3. ASPECTOS ÉTICOS	22
4. RESULTADOS	23
4.1 EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA	23
4.2 EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO ..	24
4.3 ATIVIDADE DA IL-1 β E IL-6 NO HIPOCAMPO.....	25
5. DISCUSSÃO	27
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
7. REFERÊNCIAS	32
ANEXO A - Carta de aprovação da pesquisa pelo CEUA da UNOCHAPECÓ	38

1. INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior (TDM) é um dos transtornos psiquiátricos mais prevalentes. Envolve sintomas clínicos como humor deprimido, anedonia, fadiga, perda de energia, sensação de inutilidade ou culpa excessiva, e diminuição da capacidade de concentração. (LARSEN *et al.*, 2010). O TDM abrange uma heterogeneidade de processos biológicos, os quais juntamente com as expressões comportamentais, são alvos de estudos em diversos protocolos, tanto em humanos quanto em animais. Devido a essa heterogeneidade, as respostas aos tratamentos ainda são bastante inconsistentes (BELMAKER; AGAM, 2008).

O TDM é considerado um grave problema de saúde pública, responsável por grande impacto psicossocial além da repercussão na saúde geral. O transtorno se apresenta de maneira prevalente e crescente em populações de todos os continentes além de configurar como um dos mais sérios problemas de saúde pública no início do século XXI (BOING *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2018). Segundo WHO, 2017, aproximadamente 4,4% da população mundial sofre com depressão e o TDM é considerado o maior responsável por incapacidades ao longo da vida, correspondendo a 7,5% dos anos vividos. É importante destacar que o TDM é o principal responsável pelo grande número de mortes por suicídio no mundo (WHO, 2017).

O TDM apresenta comorbidade com vários transtornos psiquiátricos, e algumas das comorbidades parecem estar envolvidas na pobre resposta aos tratamentos com antidepressivos clássicos (DE CARLO *et al.*, 2016). Mesmo em ensaios com antidepressivos em condições ideais, a maioria dos pacientes com TDM, aproximadamente 60%, não atinge a remissão na fase aguda do tratamento, levando geralmente 12 semanas para o início da resposta terapêutica (KIM, *et al.*, 2021). Além disso, segundo meta-análise, após o tratamento antidepressivo contínuo por pelo menos 6 meses, a taxa média de remissão do transtorno depressivo foi de 51% na atenção primária e 62% em estudos controlados (DAWSON, *et al.*, 2004).

O estresse na infância é um dos fenômenos que mais contribuem para a precipitação da expressão de um genótipo predisponente ao TDM (DASKALAKIS *et al.*, 2013; IGNÁCIO *et al.*, 2014). O modelo de PM é um protocolo animal validado para as pesquisas sobre a fisiopatologia e investigação de estratégias terapêuticas para o TDM. Uma característica relevante do protocolo de PM é o fato de mimetizar

uma situação grave, envolvendo violência, perda e negligência do cuidado em crianças, sendo considerado um dos estressores naturais mais poderosos durante o desenvolvimento (IGNÁCIO *et al.*, 2017).

O estresse repetido diminui a expressão e sinalização do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF, da expressão em inglês: brain-derived neurotrophic factor) prejudicando a plasticidade cerebral, promovendo atrofia neuronal e diminuição do número de sinapses. Isso resulta em adaptação deficiente ao ambiente, comprometendo o aprendizado e o enfrentamento do estresse (PRICE; DUMAN 2020; KIMPTON, 2012). Entre outros mecanismos biológicos que sofrem alterações, estão a via de sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, da expressão em inglês: mammalian target of rapamycin) (IGNÁCIO *et al.*, 2016) além da desregulação no balanço oxidativo e da função imune e inflamatória (ORTMANN *et al.*, 2017).

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 citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL) (IL-1, IL-2 e IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (DOWLATI *et al.*, 2010).

Estudos mostram que a PM nos primeiros dias de vida foi capaz de ativar resposta neuroimune no hipocampo e aumentar a expressão de genes inflamatórios. As citocinas são reguladas pela expressão gênica e coordenam a comunicação célula a célula, a função neuroquímica e neuroendócrina que estão relacionadas à fisiologia do comportamento. Estímulos ambientais são importantes para a modulação de padrões e a relação com o ambiente. Agentes estressores podem alterar essa função fisiológica, impactando no desenvolvimento do SNC de mamíferos. Os principais estressores da vida, especialmente os que envolvem estresse interpessoal, rejeição, PM, estão entre os fatores de risco para o TDM. (AMINI-KHOEI *et al.*, 2019; SLAVICH, 2014).

As funções do eixo HPA fazem parte dos mecanismos mais estudados da relação de estresse no início da vida com o TDM e outros transtornos psiquiátricos. Digno de nota foi o fato de que animais submetidos à PM tiveram uma reação

comportamental alterada e um aumento nos níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, da expressão em inglês: Adrenocorticotrophic Hormone) e corticosterona, bem como redução na expressão de BDNF no hipocampo e estriado após um estressor agudo na idade adulta (LIPPMANN *et al.*, 2007).

Uma pesquisa recente apontou que a função da micróglia é um dos mecanismos importantes que podem estar envolvidos no TDM (PRINZ; PRILLER, 2014). Ocorreu um aumento das moléculas sinalizadoras de ativação da micróglia no Córtex Pré Frontal (CPF), ínsula e córtex cingulado em um estudo *in vivo* em pacientes com TDM e uma correlação positiva com a gravidade da depressão (SETIAWAN *et al.*, 2015). Entre os mediadores e mecanismos de ativação microglial, tanto periféricos quanto centrais, estão as citocinas, vários mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, neurotransmissores e hormônios liberados durante o estresse crônico. O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias pode levar a um aumento na atividade da enzima Indoleamina 2,3 Dioxigenase (IDO), que realiza a degradação do triptofano, o aminoácido precursor da serotonina (RÉUS *et al.*, 2015).

Um número relevante de pesquisas mostra 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 importante de mecanismos para a compreensão da fisiopatologia do TDM.

Com relação ao registro dos compostos farmacológicos já consolidados na terapia como antidepressivos, o Escitalopram é um antidepressivo clássico pertencente ao grupo dos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRSs). Entre os mecanismos biológicos mais estudados atualmente, estão a função positiva na via mTOR (SEO *et al.*, 2017), BDNF (WOLKOWITZ *et al.*, 2011), balanço oxidativo e função imune (MUNZER *et al.*, 2013).

O uso de plantas de forma terapêutica já vem da antiguidade, estando intimamente ligado à nossa própria evolução. Para usar plantas como remédios, os antigos fizeram uso de suas próprias experiências e observação do uso de plantas por animais (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece as plantas medicinais e seus constituintes químicos como importantes instrumentos de assistência farmacológica, de modo que, dentre as estratégias para

a Medicina Tradicional e Complementar 2014-2023, tem incentivado a regulação desses produtos, a fim de garantir a segurança, qualidade e eficácia (WHO, 2013).

Entre muitas espécies já estudadas com relação aos efeitos antidepressivos, encontra-se a espécie *A. citriodora*, pertencente à família Verbenaceae (ERAM *et al.*, 2012). Estudos acerca de atividades comportamentais e biológicas da espécie, principalmente em animais e protocolos *in vitro*, trazem evidências de que a *A. citriodora* promove efeitos sedativos, ansiolíticos, antidepressivos, anestésicos, antioxidantes, neuroprotetores, além de efeitos antimicrobianos e antineoplásicos (BHARAMSOLTANI *et al.*, 2018).

Sendo assim, decidiu-se investigar se o estresse de PM nos primeiros dias de vida exerceu efeitos tipo depressivos e se apresentou relação com a neuroinflamação hipocampal em ratos adultos submetidos a estresse de privação maternal nos primeiros dias de vida. Em seguida, foi avaliado o efeito do tratamento crônico com extrato hidroalcoólico da espécie *A. citriodora* sobre comportamentos tipo depressivos e mecanismos neuroinflamatórios e neuroprotetores, em ratos submetidos a estresse de privação maternal nos primeiros dias de vida.

1.1 ASPECTOS GERAIS DA *A. citriodora*

A espécie *A. citriodora* Palau (Verbanaceae) apresenta diversas sinonímias científicas sendo as mais importantes: *A. triphylla* (L Hér), *A. triphylla* (L'Hér.) Britton, *Lippia citriodora* Kunth, *L. citrodora* Kunth e *L. triphylla* (L'Hér.) (BHARAMSOLTANI *et al.*, 2018).

A *A. citriodora* é nativa da América do Sul (Argentina, Paraguai, Brasil, Uruguai, Chile, Bolívia e Peru), com ampla distribuição no Norte da África e no Sul da Europa. Foi introduzida no velho continente pelos espanhóis e portugueses no século XVII. No Algarve é denominada de bela-luísia e em outras regiões de Portugal tem como nome comum, limonete. No Brasil, dependendo da região, é popularmente conhecida como cidró, falsa-erva-cidreira, lúcia-lima, limão-verbena e erva-luisa (LORENZI; MATOS, 2002; BARAMSOLTANI *et al.*, 2018).

1.2 USOS POPULARES DA *A. citriodora*

O uso tradicional desta espécie remonta ao século XVII, revelando sua

importância etnofarmacológica como planta medicinal usada pela cultura inca (ELECHEOSA, 2017). Os "Kallawayas", um grupo itinerante de curandeiros tradicionais nos Andes, costumavam chamar a planta como "quechua" ou "wari pankara", usada como digestiva, antiespasmódica e remédio para bronquite e problemas cardíacos (GIRAULT, 1987).

Infusões foliares de *A. citriodora* são utilizadas como refrescantes. Na indústria é empregada na preparação de perfumes, como aromatizante de licores. No Peru é componente do refrigerante "Inka Cola". No Egito é tradicionalmente utilizada devido às suas propriedades medicinais, sendo também comercializada na perfumaria, devido à forte composição de citral e limoneno em suas folhas (IBRAHIM; MOHAMED; KHALID, 2014).

No Brasil é comumente cultivada em jardins e hortas, sendo seu uso principal destinado para fins medicinais e eventualmente para o tempero na culinária, como por exemplo, em saladas (LORENZI; MATOS, 2008). Nas diversas regiões do Brasil, o preparado caseiro a partir de suas folhas é utilizado no tratamento de resfriados, gripe, problemas nervosos, acne, inseticida, bactericida, tônico, antiespasmódico e carminativo (MAIA; FRANCISCO, 2001; NEGRELLE *et al.*, 2007; LORENZI; MATOS, 2008; MERÉTIKA; PERONI; HANAZAKI; 2010).

1.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA *A. citriodora*

Diversos compostos químicos foram identificados em diferentes partes de *A. citriodora*. Vários flavonoides foram isolados de extratos metanólicos, etanólicos e aquosos da planta. Além disso, o óleo essencial é composto principalmente de monoterpenos e monoterpenóides, sesquiterpenos e sesquiterpenóides, bem como alguns álcoois graxos (IBRAHIM; MOHAMED, KHALID, 2014; BARAMSOLTANI *et al.*, 2018). No óleo essencial também foram observados compostos como o geranial, neral, limoneno e citral (FREDDO, 2016). Frequentemente são encontrados nas folhas jovens o β -pineno, acetato neral e transcalameneno (IBRAHIM; MOHAMED, KHALID, 2014). Ainda, os componentes limoneno, 1,8-cineol, geranial, neral, β -guanina, espesolenol e óxido de cariofileno foram isolados das folhas e flores de *A. citriodora* (SHAHHOSEINI; HOSSENEI; GHORBANPOUR, 2014).

O extrato aquoso de *A. citriodora* demonstrou efeitos sedativos no teste de campo aberto realizado com ratos, e teve sua ação potencializada com o uso do

diazepam. As ações sedativas foram sensíveis ao antagonismo por flumazenil, sugerindo que a atividade biológica da *A. citriodora* ocorre através de receptores centrais do sistema gabaérgico. Nos receptores α -adrenérgicos o extrato bloqueou de forma não competitiva a ação da fenilefrina nos vasos deferentes, e no coração induziu inotropismo negativo. A sedação do tipo benzodiazepínico, o inotropismo negativo e o efeito antiespasmódico justificam pré-clinicamente seu uso popular nos quadros de cólicas abdominais e como coadjuvante no tratamento da ansiedade (RAGONE, 2010).

A espécie apresenta artemitina e hesperidina, substâncias altamente anti-inflamatórias e antioxidantes que parecem fortemente relacionadas às propriedades antidepressivas (GUPTA; GUPTA; VARSHNEY, 2020). Eram *et al.* (2012) confirmaram o efeito antidepressivo de *A. citriodora* em modelos animais pelos extratos etanólico, clorofórmico e aquoso. O resultado foi observado a partir dos testes de natação forçada e suspensão da cauda. Outro estudo com modelos animais de depressão, utilizando a espécie *Aloysia gratíssima* como tratamento e os mesmos testes para verificar o efeito, indicou ação antidepressiva da espécie do mesmo gênero (ZENI *et al.*, 2013)

Sendo assim, decidiu-se investigar se o estresse de PM nos primeiros dias de vida exerceu efeitos tipo depressivos e se apresentou relação com a neuroinflamação hipocampal em ratos adultos submetidos a estresse de privação materna nos primeiros dias de vida. Em seguida, foi avaliado o efeito do tratamento crônico com extrato hidroalcoólico da espécie *A. citriodora* sobre comportamentos tipo depressivos e mecanismos neuroinflamatórios e neuroprotetores, em ratos submetidos a estresse de privação materna nos primeiros dias de vida.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E SOLVENTES

Nas análises cromatográficas por Cromatografia Líquida de Alto Eficiência (CLAE), foi utilizado o cromatógrafo Varian® Pro-Star com injetor manual (alça de 20 µl), com gradiente ternário de bombas, detector UV/Vis e coluna Kromasil® ODS (5µm) fase reversa C-18 (250 x 4,5 mm). O padrão analítico utilizado foi o verbascosídeo adquirido da empresa Sigma-Aldrich®, USA.

Para o processo de filtração de amostras e solventes, utilizou-se filtros Micropore® de teflon (0,45 µm). Os solventes grau HPLC (MeOH, EtOH, H₃PO₄, AcOH e HCO₂H) utilizados para as análises em CLAE foram adquiridos da J.T. Baker® (Goiânia, GO, Brasil). A água foi obtida por ultrapurificador de água Milli-Q A10 Gradiente®. Os solventes MeOH, EtOH, AcOEt, n-hexano, DCM, e CHCl₃ utilizados nas análises fitoquímicas foram adquiridos da Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

As análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de prótons (400 MHz) e de carbono (100 MHz) foram realizadas em equipamento Bruker® modelo DRX 400 na Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob orientação do Prof. Dr. Andersson Barison. A identificação das substâncias em espectrometria de massas foi realizada por intermédio de análise de infusão direta em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Applied Biosystems® modelo API 3200) equipado com uma bomba seringa (Harvard Apparatus®, modelo Harvard 22 Dual) e fonte de ionização por eletrospray (ESI) na Universidade Estadual Paulista (UNESP; Campus Litoral) sob orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas. Os métodos espectrofotométricos de Radiação Ultravioleta e Visível (UV/Vis) foram realizados em fotômetro digital semiautomático (BioSystems®, modelo BTS 310).

2.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS

Para a realização deste estudo, foi utilizado o tipo de pesquisa quantitativa analítica, de natureza experimental. A preparação do material vegetal, produção dos extratos, frações e o isolamento de substâncias químicas por meio de métodos cromatográficos foram realizados no Laboratório de Farmacognosia, da Universidade Comunitária de Chapecó (UNOCHAPECÓ).

O experimento com o uso de animais foi realizado no Centro de Bioterismo (CBI) da UNOCHAPECÓ com registro no Conselho Regional de Medicina Veterinária

de Santa Catarina (CRMV/SC) n. SC-08771-PJ, sob supervisão da médica veterinária responsável, Natacha Trevisani (CRMV/SC-nº4815SC). O referido centro possui uma infraestrutura de criação e experimentação registrada no Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA) e segue rigorosamente as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

As análises dos tecidos cerebrais foram realizadas nos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, SC.

2.3 COLETA, IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E PREPARAÇÃO DOS VEGETAIS

A coleta de *Aloysia citriodora* Palau (Verbenaceae) foi realizada em Chapecó (SC) (27° 05' 37" S e 52° 39' 58" O), nos meses de janeiro e março de 2018. No momento da coleta, uma pequena amostra (em torno de 30 cm) contendo folhas e inflorescências da planta foi reservada para elaboração de exsicata visando a identificação botânica. Posteriormente, o material vegetal foi identificado pelo Prof. Adriano Dias de Oliveira, curador do Herbário da Unochapecó, onde uma exsicata foi depositada (n. 3777). A quantidade restante da planta (aproximadamente 1000 g) foi transferida para o Laboratório de Farmacognosia da Unochapecó. O material vegetal foi reduzido a pequenos fragmentos e submetido à secagem em temperatura ambiente (± 25 °C), protegido da luz direta e umidade. Na sequência, a droga vegetal desidratada foi triturada em moinho de facas (Ciemlab®, CE430), selecionada em tamis 425 μ m (35 Tyler/Mesh), identificada e armazenada ao abrigo da luz.

2.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O Extrato Hidroalcoólico de *A. citriodora* (EHA) foi produzido por maceração (3 dias) com o material vegetal dessecado (400 g), utilizando etanol (70% v/v; 3 l) (AZWANIDA, 2015; RASHID et al., 2019). Após a filtração por Büchner, o extrato foi evaporado sob pressão reduzida, liofilizado, pesado e estocado em freezer a -20 °C.

2.5 ANÁLISE QUÍMICA

2.5.1 Estimativa do teor total de flavonoides

A quantidade de flavonoides totais em EHA foi realizada de acordo com Woisky

e Salatino (1998), com adequações. Resumidamente, 1 ml de EHA (1000 µg/ml) foi adicionado a 1 ml de Cloreto de Alumínio (AlCl₃) a (2% em MeOH) e após 60 min foram realizadas leituras do espectrofotômetro (425 nm). A curva de calibração foi produzida em temperatura ambiente (± 25 °C), protegido da luz direta e umidade. Na sequência, a planta vegetal desidratada foi triturada em moinho de facas (Ciemlab®, CE430), selecionada em tamis 425 µm (35 Tyler/Mesh), identificada e armazenada ao abrigo da luz. utilizando padrão de quercetina diluída em metanol (10, 15, 20, 25 e 30 µg / ml), e as leituras foram realizadas em triplicata. A quantificação dos flavonóides foi determinada em miligramas por grama de extrato.

2.5.2 Quantificação de fenóis totais

Determinação dos componentes fenólicos em EHA foi realizado conforme o método de Folin-Ciocalteu modificado por Singleton e Rossi (1965). O EHA foi diluído em álcool etílico nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 µg/ml. A cada 0,5 ml de extrato nas diferentes concentrações foram adicionados 5 ml de água destilada e 0,25 ml do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, 1 ml de solução de Na₂CO₃ a 10% foi adicionado e a mistura armazenada por 1 h. As análises foram realizadas em triplicata e a absorbância mensurada a 725 nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

2.6 ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DO EHA

As análises cromatográficas foram realizadas, de acordo com Apáti *et al.*, (2006) com modificações. Para tanto, foi utilizado cromatógrafo Varian® Pró-Star com injetor manual (20 µL), gradiente ternário de bombas, detector UV/Vis e coluna Kromasil® ODS (5µm) fase reversa C-18 (250 x 4,5 mm) em temperatura de 24 ± 2 °C. Dois sistemas de solventes foram utilizados, H₂O: AcOH (40:1 v/v) (solvente A) e CH₃CN (solvente B). A análise foi realizada em temperatura de aproximadamente 22 °C com vazão de 1ml/min. O gradiente utilizado foi 86% de A por 15 min, 65% de A por 30 min e 100% de B por 2 min. A detecção foi realizada em 360 nm e os resultados foram comparados com padrões externos autênticos com tempos de retenção seguido

de espectro de UV.

2.7 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO QUÍMICO

A amostra de EHA (50 g) foi diluída em béquer com água destilada (500 ml) e submetida a agitação mecânica. Posteriormente, esta solução foi transferida para o funil de separação e foram realizadas partições ($n = 10$) com solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila, diclorometano e n-butanol). As frações obtidas foram concentradas em rotavapor sob pressão reduzida, pesadas para o cálculo de rendimento e estocadas em freezer.

Na sequência, as frações foram submetidas à Cromatografia em Camada Delgada (CCD). aplicando-se 20 μ l em placa de gel de sílica 60 F254 Merck® (lote HX772843). O sistema eluente utilizado foi uma mistura dos solventes: AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10 v/v). Na sequência, as placas foram secas em temperatura ambiente e as bandas foram observadas em 366 nm em câmara de UV/Vis e posteriormente reveladas com cloreto férrico a 1% em MeOH (m/v) (WAGNER; BLADT, 1996). A fração que revelará bandas com maior positividade para compostos fenólicos foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica.

Para o fracionamento, uma amostra da fração acetato de etila (AcOEt; 4 g) foi dissolvida em quantidade suficiente de hexano e submetida à Cromatografia Líquida em Coluna (CLC) utilizando como fase estacionária gel de sílica (Merck®), e como eluente o hexano e AcOEt. A eluição da coluna foi realizada com alíquotas de 5 ml e o eluente teve incremento de polaridade em 10%, até alcançar 100% de AcOEt. As subfrações foram reunidas por semelhança em CCD empregando como fase móvel AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10 v/v) e analisadas em câmara de UV/Vis a 366 nm.

2.8 AQUISIÇÃO DO COMPOSTO OXALATO DE 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.

2.9 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS

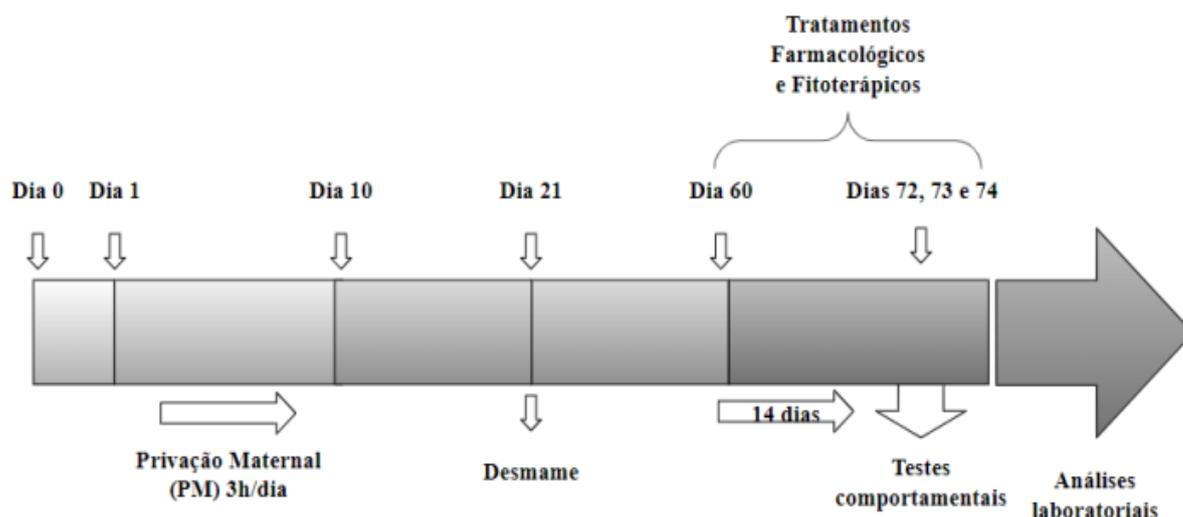
2.9.1 Protocolo de privação maternal

Os filhotes foram privados da mãe por 3 h/dia nos primeiros 10 dias após o nascimento. A privação maternal (PM) constituiu-se da remoção da mãe da caixa, mantendo os filhotes na presença de odor materno. 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.

Foram constituídos dois grupos experimentais: Grupo PM (dividido em três subgrupos), e grupo controle Sem Estresse (SE). Após completar 60 dias de idade, os ratos foram separados em subgrupos (N = 10) e submetidos a tratamento crônico por 14 dias com as substâncias escolhidas para o experimento: Escitalopram como controle positivo na dose de 10 mg/kg (antidepressivo clássico), extrato hidroalcoólico de *Aloysia citriodora* (Ac). Grupos controles para os tratamentos receberam solução de salina. As doses de escitalopram estão de acordo com trabalhos publicados na literatura científica (IGNÁCIO *et al.*, 2018). O delineamento experimental está ilustrado na figura 1. A administração de extratos e drogas foi feita oralmente pelo método de gavagem. Os seguintes grupos experimentais foram delineados, considerando o estresse, o tratamento com uma dose de escitalopram e do extrato de *A. citriodora*: Controle + Salina; PM + Salina; PM + escitalopram; PM + *A. citriodora*.

Desenho experimental

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



comportamentais.

2.9.2 Testes comportamentais

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

O comportamento depressivo foi avaliado pelo Teste de Natação Forçada (TNF), conforme descrito anteriormente por Porsolt *et al.*, (1977) ($n = 10/\text{grupo}$) e a atividade motora exploratória foi avaliada por meio do Teste de Campo Aberto (TCA), como descrito anteriormente por Réus *et al.* (2013) ($n = 10/\text{grupo}$). Para a análise de marcadores inflamatórios, os animais foram eutanasiados por decapitação e foi realizada a extração do cérebro. Após a extração do cérebro, o hipocampo foi separado, com base na descrição histológica de Paxinos e Watson (1986).

2.10 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

As análises dos níveis de IL-1 β e IL-6 no hipocampo foram realizadas através

de kits ELISA seguindo os protocolos dos fabricantes dos kits. Para o processo de 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 durante 15 minutos e o sobrenadante foi coletado para uso nas análises.

Utilizou-se do método de Peterson (Lowry modificado) para a quantificação das proteínas. A curva e 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, no formato sanduíche. Foi adicionado 100 μ l de cada padrão e amostra nos poços apropriados, coberto os poços e incubados 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. Em seguida descartou-se a solução e repetiu-se o procedimento. Foi adicionado 100 μ l de solução de Estreptavidina 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) em cada poço, os quais foram cobertos e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro, com agitação suave. Adicionou-se 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 expressos em picogramas por miligramas (pg/mg) de proteína.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) one-way, seguido do teste post-hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas por meio do software Statistica 7.0

3. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa intitulado “Efeito antidepressivo e anti-inflamatório da

espécie *Aloysia citrodora* em ratos adultos submetidos a privação maternal na infância” é um subprojeto que está vinculado a um projeto maior intitulado “Efeito antidepressivo, ansiolítico e neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Aloysia citrodora* em animais submetidos a estresse na infância e na vida adulta” que foi submetido ao CEUA com o seguinte protocolo: nº 005/CEUA/2021 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (UNOCHAPECÓ), em 29/07/2021, local onde as protocolos dos extratos da planta e dos experimentos com os animais foram realizados.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

Os efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da *A. citriodora* (30 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 mostrou interação significativa no tempo de imobilidade entre os grupos sem estresse e os grupos privados maternalmente e entre os tratamentos ($F= 5,03377$; $P: 0,004727$). O teste Post hoc de Tukey mostrou que a PM elevou significativamente o tempo de imobilidade ($p < 0,02$) no teste de natação forçada. Os tratamentos com *A. citriodora* e Esc reverteram o efeito da PM, ambos com ($p < 0,02$).

No que diz respeito ao tempo de natação, observou-se na ANOVA que a PM apresentou uma significativa diminuição desse comportamento ($F= 5,1787$; $P < 0,005471$). O teste de Post hoc de Tukey mostrou que o grupo PM apresentou menor tempo de natação em comparação ao grupo tratado com escitalopram ($p < 0,02$); controle salina ($p < 0,02$) e em relação ao grupo tratado com *A. citriodora* ($p < 0,04$). Por fim, no teste de escalada, do nado forçado, não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Teste de Natação Forçada

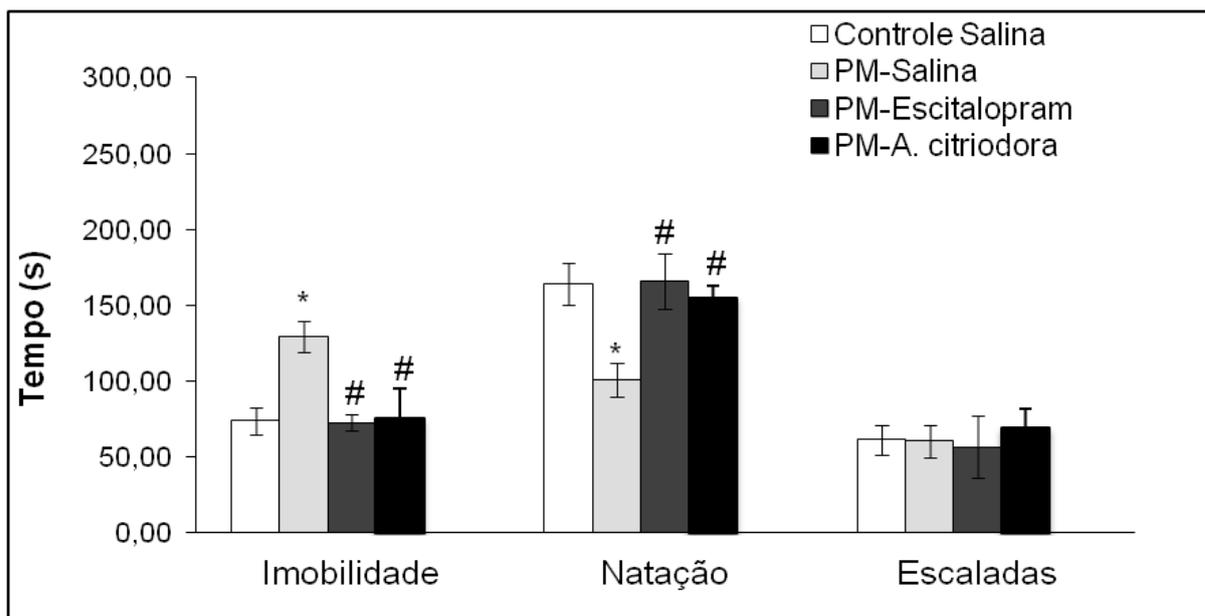


Figura 2 - Efeitos do estresse de PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Sobre o parâmetro de mobilidade: *diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,05$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$). Sobre o parâmetro de natação: *diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,05$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$).

4.2 EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO

Os efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da *A. citriodora* (30 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 de PM. Tanto a PM quanto os tratamentos não induziram alterações significativas na atividade locomotora, avaliada através dos números de cruzamentos ($F=2,40$; $p > 0,05$) e levantamentos ($F=2,11$; $p > 0,05$) no teste do campo aberto.

Atividade Locomotora no Campo Aberto

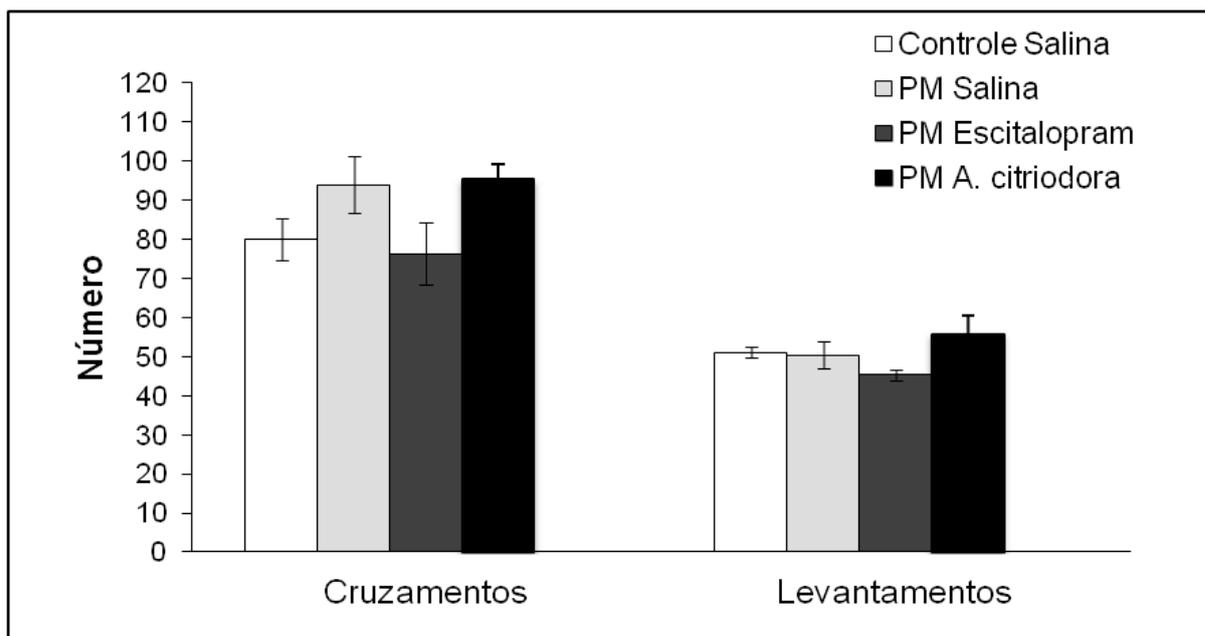


Figura 3 - Efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

4.3 NÍVEIS DE IL-1 β E IL-6 NO HIPOCAMPO

Os efeitos da PM assim como do tratamento com *A. citriodora* (30 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo, estão ilustrados da figura 4. A ANOVA de uma via revelou interação significativa de IL-1 β ($F=14,77$ e $p < 0,001$) e IL-6 ($F=12,23$ e $p < 0,001$), entre os grupos. O teste Post hoc de Tukey mostrou que a PM induziu aumento significativo dos níveis de IL-1 β ($p < 0,05$). A *A. citriodora* ($p < 0,001$) e o escitalopram ($p < 0,01$) reverteram os níveis elevados de IL-1 β , induzidos pela PM. A PM também aumentou, de modo ainda mais significativo, os níveis de IL-6 ($p < 0,01$). Os tratamentos com *A. citriodora* ($p < 0,001$) e com escitalopram ($p < 0,01$) reverteram os níveis elevados de IL-6, induzidos pela PM.

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

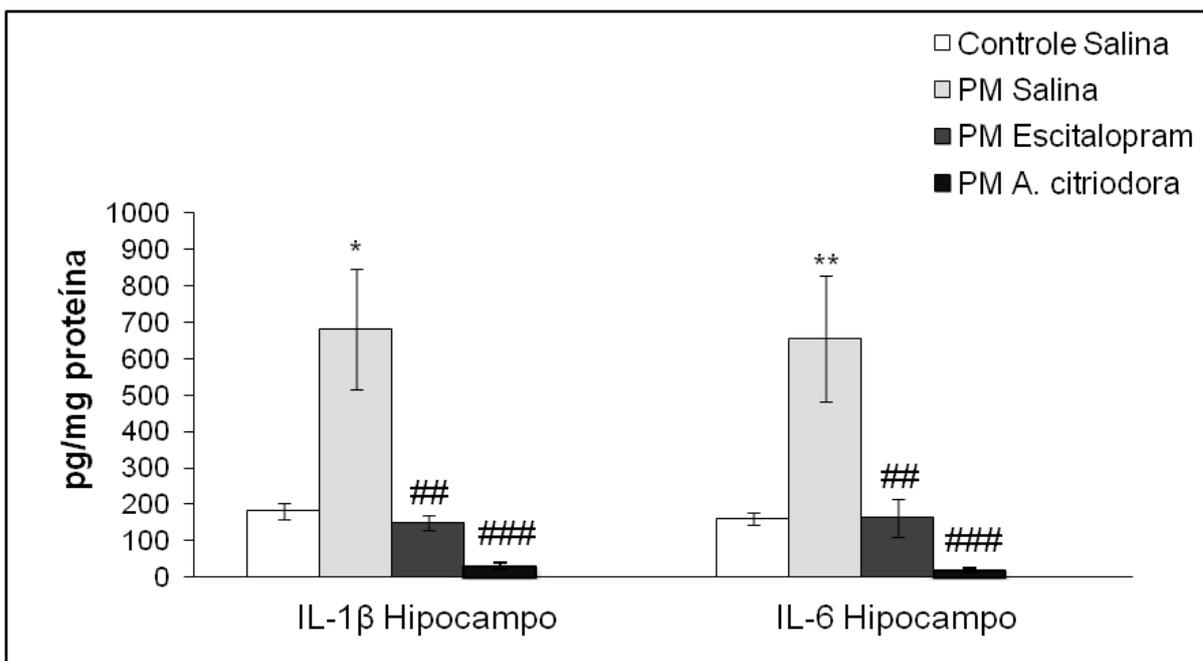


Figura 4 - Efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. *diferença estatística entre Controle Salina e PM Salina ($p < 0,05$); **diferença estatística entre Controle Salina e PM Salina ($p < 0,01$); ##diferente do PM salina ($p < 0,01$); ###diferente do PM salina ($p < 0,001$).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou o efeito do extrato alcoólico da *A. citriodora* e do antidepressivo clássico, escitalopram, sobre comportamentos do tipo depressivos, no teste de natação forçada, em ratos adultos submetidos a estresse de PM nos primeiros dias de vida. Também foram avaliados marcadores inflamatórios no hipocampo dos animais submetidos ao estresse e ao teste comportamental.

O período neonatal, é fundamental para o processo de desenvolvimento neuronal, principalmente, pelo fato de os animais serem praticamente dependentes da mãe nessa fase. Estudos mostram que a PM induz mudanças no comportamento que podem alterar marcadores inflamatórios relacionados à fisiopatologia do TDM (AMINI-KHOEI et al., 2019; IGNÁCIO et al., 2017).

Estudos experimentais encontraram alterações marcantes no córtex e no hipocampo de roedores após neuroinflamação induzida com lipopolissacarídeo. A indução mimetiza comportamento semelhante à ansiedade, exacerba o estresse oxidativo e gera inflamação devido à alta peroxidase lipídica que aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6, além de TNF- α . (NAEEM, et al., 2021). Diversas plantas medicinais têm apresentado ação antidepressiva em modelos animais. Algumas apresentam ação antioxidante, regulam o eixo hipotálamo-hipófise adrenal, reduzem mediadores inflamatórios, além de regular moléculas endógenas como noradrenalina, acetilcolina, dopamina (GUPTA, 2020).

Um dos fármacos tradicionais mais utilizados para o tratamento do TDM, ansiedade além de outros distúrbios psiquiátricos é o escitalopram. Este atua como Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina (ISRSs), mantendo a substância por mais tempo na fenda sináptica que pode corrigir o provável déficit na sinalização celular durante o TDM, e com isso trazer alívio clínico para alguns pacientes. No entanto, há um número significativo de indivíduos resistentes aos ISRSs. Há evidências de que a inflamação desempenha um papel fundamental na variabilidade clínica dos ISRSs.

Embora a modulação sináptica da serotonina não seja esclarecida, a capacidade do escitalopram em aumentar os níveis de serotonina necessários para eficácia do tratamento para TDM, foi reduzida pela inflamação aguda induzida em roedores. (HERSEY, et al., 2021). Acredita-se que a ação antiinflamatória da *A. citriodora*, pode atuar como antidepressivo assim como potencializar a ação do fármaco escitalopram, uma vez que a inflamação prejudica a capacidade farmacológica do mesmo.

Os resultados obtidos em testes comportamentais e nos marcadores inflamatórios foram considerados relevantes, pois mostram reversão de comportamentos tipo depressivos nos parâmetros de imobilidade, natação e teste do nado forçado. Além disso, reduziu os níveis das interleucinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo de ratos tratados com *A. citriodora*. Vale lembrar a forte relação entre a neuroinflamação e o desenvolvimento de transtornos depressivos (CARVALHO et al., 2014; IGNÁCIO, et al., 2017, MOUIHATE, 2014; STRAWBRIDGE, et al., 2021).

Nesse estudo, dois testes comportamentais foram realizados com a finalidade de avaliar os impactos da PM e dos tratamentos, o teste de natação forçada e de campo aberto. Nos resultados a partir do teste de natação forçada, que é composto pelos parâmetros de tempo de imobilidade, natação e escalada, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sobretudo nos parâmetros de tempo de imobilidade e de natação. O teste do campo aberto, que avalia possíveis efeitos sedativos dos tratamentos, não revelou diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Sobre o teste de natação forçada, de acordo com Arauchi et al., (2018); e Haraguchi et al., (2018), é um teste amplamente utilizado em pesquisas experimentais com animais, com a finalidade de avaliar comportamentos tipo depressivos, que podem ser desencadeados através de protocolos animais por meio de estresse crônico, similar ao que ocorre com a PM. A literatura indica que esse teste é capaz de avaliar substâncias com potencial antidepressivo, sobretudo ao considerar que os antidepressivos clássicos, caso de escitalopram utilizado nessa pesquisa, induzem respostas comportamentais tipo antidepressivas em animais submetidos ao teste de natação forçada (ARAUCHI et al., 2018; HARAGUCHI et al., 2018).

A ANOVA revelou que no parâmetro de imobilidade, o grupo PM teve esse indicador aumentado em relação ao grupo controle. Ao avaliar o Post Hoc – Turkey, observou-se que tanto o grupo controle, quanto os grupos escitalopram e *A. citriodora* obtiveram como resultado ($p < 0,02$). Dessa forma, é possível concluir que os grupos tratados apresentaram redução de comportamentos tipo depressivos e se comportaram de forma similar ao grupo controle, corroborando com literatura científica acerca dos efeitos antidepressivos da *A. citriodora* e do escitalopram, esse tem que tem seu mecanismo de ação por meio do aumento da recaptação de neurotransmissores na fenda sináptica (ERAM et al. (2012); HARAGUCHI et al., 2018).

Sobre o tempo de natação, outro parâmetro do teste de natação forçada, a ANOVA revelou diferença estatística significativa entre o tempo de natação do grupo PM em relação ao grupo controle. No teste de Post hoc – Turkey, observou-se, assim como na imobilidade, uma semelhança estatística entre os grupos controle, escitalopram e *A. citriodora* ($p < 0,05$). Os resultados obtidos no teste de tempo de natação vão ao encontro daqueles vistos no teste de imobilidade, confirmando, mais uma vez, que os tratamentos são eficientes em reverter os comportamentos tipo depressivos.

Como é possível observar, os resultados obtidos no teste de natação forçada, nos grupos estudados, mostraram que o extrato hidroalcoólico de *A. citriodora* (30 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg), apresentaram ação semelhante ao grupo controle. Assim, ambos os tratamentos tiveram uma ação de reduzir comportamentos tipo depressivos induzidos pelo estresse no início da vida. Esses resultados corroboram com as evidências encontradas na literatura, sobretudo quando é observado o grupo escitalopram, que é amplamente utilizado em pesquisas com modelo animal e atuam tanto na redução de comportamentos tipo depressivos, quanto na ação em mecanismos biológicos importantes para a proteção neuronal e na redução da inflamação (MUNZER et al., 2013; SEO et al., 2017; WOLKOWITZ et al., 2011).

Antidepressivos podem induzir efeito sedativo importante e interferir no comportamento de mobilidade em animais. Para avaliar essa possível ação dos fármacos e extratos, realizou-se o teste de campo aberto, que de acordo com Gould et al (2009), tem a finalidade de medir a atividade exploratória geral em roedores. Para isso utiliza de medidas de quantidade e qualidade, por meio de diferentes parâmetros, como cruzamentos e levantamentos. A ANOVA não revelou diferença estatística entre os diferentes grupos do estudo, o que indica que tanto a PM, como os tratamentos com escitalopram e com o extrato de *A. citriodora*, não exerceram efeitos sedativos nos animais. O efeito não sedativo é importante pois mantém os animais ativos e responsivos tanto em relação ao ambiente tranquilo quanto em relação à capacidade de luta e fuga testadas no experimento.

A PM elevou os níveis das interleucinas inflamatórias quando comparado ao grupo controle. Ao serem submetidos ao tratamento com escitalopram, os níveis de interleucinas elevados pela PM foram revertidos a níveis semelhantes ao grupo controle. Já o grupo tratado com *A. citriodora*, reduziu os níveis de interleucina a

valores ainda menores que as interleucinas do grupo controle salina. O que significa dizer que o extrato da planta apresentou grande poder antiinflamatório neuronal.

Apesar dos avanços nos tratamentos farmacológicos sintéticos, apenas 50% dos casos de depressão são passíveis de reversão. Além disso, causam efeitos adversos e, muitas vezes, apresentam custo elevado. Dessa forma, o uso de plantas medicinais, entre elas, a *A. citriodora* vem sendo cada vez mais explorado por pesquisadores com o intuito de melhorar a resposta e adesão ao tratamento (GUPTA, 2020). Um estudo investigou os efeitos comportamentais do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. citriodora* em ratas fêmeas e demonstrou que as substâncias foram capazes de promover efeito depressor motor, ansiolítico, enquanto em um dos testes mais utilizados para avaliar depressão, o FAST, foi possível perceber que a mobilidade do animal foi comparável à observada em animais tratados com antidepressivos de referência como fluoxetina e imipramina (MORA, et al, 2005).

Uma meta-análise, envolvendo 35 estudos, analisou biomarcadores inflamatórios antes e depois do tratamento antidepressivo e mostrou que a falta de resposta ao tratamento estava relacionada à inflamação persistente. No entanto, a boa resposta ao tratamento para TDM, estava relacionada à redução dos níveis dos marcadores inflamatórios. Dessa forma, o estudo sugere que a manutenção dos níveis elevados de inflamação pode favorecer a resistência ao tratamento do TDM (STRAWBRIDGE, et al., 2015). Sendo assim, possivelmente efeito antiinflamatório do extrato da *A. citriodora* poderá contribuir para a redução da inflamação e possivelmente do TDM.

Por fim, observou-se que os resultados obtidos nessa pesquisa através do tratamento com o extrato hidroalcoólico de *A. citriodora*, tanto nos aspectos comportamentais dos grupos experimentais, quanto aos marcadores de provas inflamatórias por meio de interleucinas, vão ao encontro das evidências encontradas na literatura. Dito isso, pois, além de reverter comportamentos depressivos de forma similar ao escitalopram, o extrato teve respostas ainda mais significativas na redução da atividade inflamatória, em relação ao antidepressivo clássico usado na pesquisa. Contudo, faz-se necessário novos estudos com compostos ativos da planta, com a finalidade de elucidar os mecanismos biológicos e como se dá essa atividade antiinflamatória nos quadros depressivos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estresse causado pelo protocolo de privação maternal em roedores culminou em um aumento significativo de comportamentos depressivos na vida adulta e aumento na expressão de substâncias inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo dos animais. O tratamento realizado com o extrato hidroalcoólico de *A. citriodora* reverteu os comportamentos depressivos de forma similar ao grupo tratado com escitalopram. Sobre os marcadores de inflamação no tecido nervoso, observou-se que os animais tratados com *A. citriodora* tiveram valores inferiores àqueles tratados com escitalopram e ao grupo controle, e ainda de modo mais significativo quando comparado ao grupo PM tratado com salina.

Os resultados obtidos através desta pesquisa indicam que substâncias presentes na espécie *A. citriodora* apresentam potencial uso como antidepressivo, uma vez que reduzem os comportamentos tipo depressivos em animais, de forma similar aos antidepressivos clássicos e atuam fortemente na redução da neuroinflamação, que está diretamente relacionado com a fisiopatologia dos transtornos depressivos.

Esse estudo vem ao encontro das preocupações da OMS, uma vez que considera o adoecimento mental, sobretudo a depressão, como uma das maiores causas de incapacitação e suicídio no mundo. Além disso, é observado que em diversas situações, por ser uma doença multifatorial, os tratamentos clássicos falham em reverter os quadros dessa doença. Dessa forma, faz-se necessário buscar alternativas terapêuticas e a *A. citriodora* mostrou-se como uma estratégia promissora.

Por fim, vale destacar a importância desse estudo não apenas no contexto da produção de novos conhecimentos, mas também pela valorização da ciência, das universidades do país e das parcerias entre diferentes instituições, que possibilitou, por exemplo, a realização destes experimentos, que evidenciaram resultados promissores.

7. REFERÊNCIAS

APÁTI, P.; KÉRY, Á.; HOUGHTON, P. J.; STEVENTON, G. B.; KITE, G. Efeito in vitro de flavonóides do extrato de *Solidago canadensis* na glutathione S-transferase. **Jornal de farmácia e farmacologia**, 58 (2), 251-256, 2006.

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.

BHARAMSOLTANI, R.; ROSTAMIASRABADIC, P.; SHAHPIRIA, Z.; MARQUES, A. M.; RAHIMIA, R.; FARZAEIF, M. H. Aloysia citrodora Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222 p. 34-51, 2018.

BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major depressive disorder. **N Engl J Med.**, v. 358, 2008.

BOING, A. F.; MELO, G. R.; BOING, A. C.; MORETTI-PIRES, R. O.; PERES, K. G.; PERES, M. A. Asociación entre depresión y enfermedades crónicas: un estudio poblacional. **Revista de Saúde Pública**, 46, 617-623, 2012.

CARVALHO, L. A.; BERGINK, V.; SUMASKI, L.; WIJKHUIJS, J.; HOOGENDIJK, W. J.; BIRKENHAGER, T. K.; DREXHAGE, H. A. Inflammatory activation is associated with a reduced glucocorticoid receptor alpha/beta expression ratio in monocytes of inpatients with melancholic major depressive disorder. **Translational psychiatry**, 4(1), e344-e344, 2014.

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. **Nat Rev Neurosci.**, v. 9, 2008.

DAWSON, M. Y.; MICHALAK, E. E.; WARAICH, P.; ANDERSON, J. E.; LAM, R. W. Is remission of depressive symptoms in primary care a realistic goal? A meta-analysis. **BMC Family Practice**, 5(1), 1-6, 2004.

DASKALAKIS, N.; BAGOT, R. C.; PARKER, K. J.; CHRISTIAAN, H. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome, **Psychoneuroendocrinology.**, v. 38, n. 9, 2013.

DE CARLO, V.; CALATI, R.; SERRETTI, A. Socio-demographic and clinical predictors of non-response/non-remission in treatment resistant depressed patients: A systematic review. **Psychiatry Res.**, v. 240, 2016.

DINAN, T. G. Inflammatory markers in depression. **Curr Opin Psychiatry.**, v. 22, 2009.

DOWLATI, Y.; NATHAN HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, E. K.; LANCTÔT, K. L. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry.**, v. 67, n. 5, 2010.

EKEANYANWU, R. C.; NJOKU, O. U. Flavonoid-rich fraction of the Monodora Tenuifolia seed extract attenuates behavioural alterations and oxidative damage in forced-swim stressed rats. **Chin J Nat Med.**, v. 13, n. 3, 2015.

ELECHEOSA, M. A. Essential oil chemotypes of *Aloysia citrodora* (Verbenaceae) in Northwestern Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 74, p. 19-29, 2017.

FREDDO, A. R.; MAZARO, S. M.; BORIN, M. S. R.; BUSO, C.; POSSENTI, J. C.; CECHIN, F. E.; ZORZZI, I. C.; DALACOSTA, N. L. Redução no tombamento *Fusarium* sp. em plântulas de beterraba, pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *Aloysia citrodora* Palau. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 4, p. 453-459, 2016.

GIRAULT, L. Kallawaya, curanderos itinerantes de Gomes, P.C.S., Ferreira, F.M., Vicente, A.M.S. In: UNICEF - OPS e OMS (Ed.), Composition of the essential oils from flowers and leaves of vervain [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] grown in Portugal. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 73-78, 1987.

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.

GONÇALVES, A. M. C.; TEIXEIRA, M. T. B.; GAMA, J. R. D. A.; LOPES, C. S.; SILVA, G. A.; GAMARRA, C. J.; MACHADO, M. L. S. M. Prevalência de depressão e fatores associados em mulheres atendidas pela Estratégia de Saúde da Família. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, 67, 101-109, 2018.

GUPTA, J.; GUPTA, R.; VARSHNEY, K. K. Emerging mechanisms and potential antidepressant action of medicinal plants. **IJPSR**, v. 11, 2020.

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.

HERSEY, M.; SAMARANAYAKE, S.; BERGER, S. N.; TAVAKOLI, N.; MENA, S.; NIJHOUT, H. F.; HASHEMI, P. Inflammation-induced histamine impairs the capacity of escitalopram to increase hippocampal extracellular serotonin. **Journal of Neuroscience**, 41(30), 6564-6577, 2021.

IBRAHIM, M. E.; MOHAMED, M. A.; KHALID, K. A. Effect of Growing Locations on the Essential Oil Content and Compositions of *Lemon Verbena* Shrubs under the Conditions of Egypt M.E. **Journal of Essential Oil**, v. 17, n. 2, p. 288-294, 2014.

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, 2014.

IGNÁCIO, Z. M.; RÉUS, G. Z.; ARENT, C. O.; ABELAIRA, H. M.; PITCHER, M. R.; QUEVEDO, J. New perspectives on the involvement of mTOR in depression as well as in the action of antidepressant drugs. **Br J Clin Pharmacol**, v. 82, n. 5, 2016.

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

IGNACIO, Z. M.; CALIXTO, A. V.; DA SILVA, R. H.; QUEVEDO, J.; REUS, G. Z. The use of quetiapine in the treatment of major depressive disorder: Evidence from clinical and experimental studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 86, 36-50, 2018.

KIMPTON, J. The brain derived neurotrophic factor and influences of stress in depression. **Psychiatr Danub.**, v. 24, n. 1, 2012.

KIM, H. Y.; LEE, H. J.; JHON, M.; KIM, J. W.; KANG, H. J.; LEE, J. Y.; KIM, J. M. Predictors of remission in acute and continuation treatment of depressive disorders. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, 19(3), 490, 2021.

LARSEN, M. H.; MIKKELSEN, J. D.; SCHMIDT, A. H.; SANDI, C. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. **J Psychiatr Res.**, v. 44. 2010.

LIPPMANN, M.; BRESS, A.; NEMEROFF, C. B.; PLOTSKY, P. M.; MONTEGGIAL, L. M. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. **Eur J Neurosci.**, v. 25, n. 10, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**, Plantarum: Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 512 p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 544p.

MAIA, E. A.; FRANCISCO, J. O uso de espécies vegetais para fins medicinais por duas comunidades de Serra Catarinense, Santa Catarina, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 1, p. 54-74, 2001.

MOUIHATE, A. TLR4-mediated brain inflammation halts neurogenesis: impact of hormonal replacement therapy. **Frontiers in cellular neuroscience**, 8, 146, 2014.

MERÉTIKA, A. H. C.; PERONI, N.; HANAZAKI, N. Local knowledge of medicinal plants in threeartisanal fishing communities (Itapoá, Southern Brazil), according to gender, age, and urbanization. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 386-394, 2010.

MORA, S., DÍAZ-VÉLIZ, G., MILLÁN, R., LUNGENSTRASS, H., QUIRÓS, S., COTO-MORALES, T., & HELLIÓN-IBARROLA, M. C. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 82(2), 373-378, 2005.

MUNZER, A.; SACK, U.; MERGL, R.; SCHÖNHERR, J.; PETERSEIN, C.; BARTSCH, S.; KIRKBY, K. C.; BAUER, K.; HIMMERICH, H. Impact of antidepressants on cytokine production of depressed patients *in vitro*. **Toxins (Basel)**, v. 5, n. 11, 2013.

NAEEM, K., AL KURY, L. T., NASAR, F., ALATTAR, A., ALSHAMAN, R., SHAH, F. A., ... & LI, S. Natural dietary supplement, carvacrol, alleviates LPS-induced oxidative stress, neurodegeneration, and depressive-like behaviors via the Nrf2/HO-1 pathway. **Journal of Inflammation Research**, 14, 1313, 2021.

NEGRELLE, R. R. B.; TOMAZZONI, M. I.; CECCON, M. F.; VALENTE, T. P. Estudo etnobotânico junto à Unidade Saúde da Família Nossa Senhora dos Navegantes: subsídios para o estabelecimento de programa de fitoterápicos na Rede Básica de Saúde do Município de Cascavel (Paraná). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 9(3), 6-22, 2007.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **VISÃO ACADÊMICA.**, V. 7, N. 2, 2006.

ORTMANN, C. F.; ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; IGNÁCIO, Z. M.; CHAVES, V. C.; SANTOS, T. C.; CARVALHO, P.; CARLESSI, A. S.; BRUCHCHEN, L.; DANIELSKI, L. G.; CARDOSO, S. G.; CAMPOS, A. M.; PETRONILHO, F.; REBELO, J.; MORAIS, M. O. S.; VUOLO, F.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F. H. LC/QTOF profile and preliminary stability studies of an enriched flavonoid fraction of *Cecropia pachystachya* Trécul leaves with potential antidepressant-like activity. **Biomed Chromatogr.**, v. 31, n. 11, 2017.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain**: stereotaxic coordinates. Academic, San Diego. 1986.

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.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature.**, v. 266(5604), 1977.

PRICE, R. B.; DUMAN, R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model. **Molecular psychiatry**, v. 25, n. 3, p. 530-543, 2020.

PRINZ, M.; PRILLER, J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 15, 2014.

RAGONE, M. I. Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora*, Palau on mice and rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 79- 86, 2010.

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 Behav Immun.**, v. 31, 2013.

REUS, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; SANTOS, M. A. B; CARLESSI, A.S.; TOMAZ, D.B.; NEOTTIA, M. V.; LIRANC, J. L. G; GUBERTB, 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.; JANSEN, K.; TITUS, S.; CARVALHO, A. F.; GABBAY, V.; QUEVEDO, J. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. **J Psychiatr Res.**, v. 68, 2015.

SEO, M. K.; CHOI, C. M.; MCINTYRE, R. S.; CHO, H. Y.; LEE, C. H.; MANSUR, R. B.; LEE, Y.; LEE, J. H.; KIM, Y. H.; PARK, S. W.; LEE1, J. G. Effects of escitalopram and paroxetine on mTORC1 signaling in the rat hippocampus under chronic restraint stress. **BMC Neurosci.**, v. 18, 2017.

SETIAWAN, E.; WILSON, A. A.; MIZRAHI, R.; RUSJAN, P. M.; MILER, L.; RAJKOWSKA, G.; SURIDJAN, I.; KENNEDY, J. L.; REKKAS, V.; HOULE, S.; MEYER, J. H. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. **JAMA Psychiatry.**, v. 72, n. 3, 2015.

SHAHZAD, N.; AHMAD, J.; KHAN, W.; AL-GHAMDI, S. S.; AIN, M. R.; IBRAHIM, A. A.; AKHTAR, M.; KHANAM, R. Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 117, 2014.

SLAVICH, GEORGE M.; IRWIN, MICHAEL R. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. **Psychological bulletin**, v. 140, n. 3, p. 774, 2014.

STRAWBRIDGE, R.; JAMIESON, A.; HODSOLL, J.; FERRIER, I. N.; MCALLISTER-WILLIAMS, R. H.; POWELL, T. R.; WATSON, S. The Role of Inflammatory Proteins in Anti-Glucocorticoid Therapy for Treatment-Resistant Depression. **Journal of clinical medicine**, 10(4), 784, 2021.

SHAHHOUSEINI, R.; HOSSEINI, N.; GHORBANPOUR, M. Study of Essential Oil Content and Composition of Different Parts of Lemon verbena (*Lippia citriodora*) Grown in Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n.1, p. 120-125, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. R., J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic- phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

STRAWBRIDGE, R., ARNONE, D., DANESE, A., PAPADOPOULOS, A., VIVES, A. H., & CLEARE, A. J. Inflammation and clinical response to treatment in depression: a meta-analysis. **European Neuropsychopharmacology**, 25(10), 1532-1543, 2015.

WAGNER; BLADT. **Plant drug analysis**. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

WHO – World Health Organization 2013. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014 – 2023**. Geneva: WHO, 2013.

WHO - World Health Organization 2017. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Geneva: Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO - World Health Organization 2013. Depressão, Folha Informativa. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/depressao>; Acesso: 18/09/2021.

WOLKOWITZ, O. M.; WOLF, J.; SHELLY, W.; ROSSER, R.; BURKE, H. M.; LERNER, G. K.; REUS, V. I. R.; NELSON, J. C. N; EPEL, E. S.; MELLON, S. H. Serum BDNF levels before treatment predict SSRI response in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v. 35, n. 7, 2011.

APÊNDICE A – Carta de aprovação da pesquisa pela 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 antidepressivo, ansiolítico e neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Aloysia citriodora* em animais submetidos a estresse na infância e na vida adulta”, protocolo nº005/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 29/07/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/02/2022 à 30/09/2022
Espécie/Linhagem/Raça	Espécie: Rattus norvegicus; Linhagem Wistar; Nome vulgar: Rato
Nº de animais	140
Peso/Idade	1 dia: 4-6 gramas; 50 dias: 200-250 gramas/ 1 e 50 dias

Sexo	Machos
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Comunitária da Região de Chapecó



Prof.ª Lilian Caroline Bohnen
Coordenadora da CEUA