

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

**ANA OLÍVIA ALBINO NICOLLETI
HÉLIO JUNGKENN IBRAHIM**

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *ALOYSIA
CITRIODORA* EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNAL
NA INFÂNCIA**

CHAPECÓ

2023

**ANA OLÍVIA ALBINO NICOLLETI
HÉLIO JUNGKENN IBRAHIM**

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE *ALOYSIA
CITRIODORA* EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO MATERNAL
NA INFÂNCIA**

Trabalho de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito parcial para obtenção do título de Médico (a).

Orientador: Prof^a Dr^a Zuleide Maria Ignácio

**CHAPECÓ
2023**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Nicolleti, Ana Olívia Albino
Efeito Aantidepressivo e Antioxidante da Espécie
Aloysia Citriodora em Ratos Adultos submetidos à
Privação Maternal na Infância / Ana Olívia Albino
Nicolleti, Hélio Jungkenn Ibrahim. -- 2023.
44 f.:il.

Orientadora: Doutora Zuleide Maria Ignácio

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Chapecó,SC, 2023.

1. Transtorno Depressivo Maior. 2. Privação Maternal.
3. Estresse Oxidativo. 4. Aloysia Citriodora. I.
Ibrahim, Hélio Jungkenn II. Ignácio, Zuleide Maria,
orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV.
Título.

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

**ANA OLÍVIA ALBINO NICOLLETI
HÉLIO JUNGKENN IBRAHIM**

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANTIOXIDANTE 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 requisito para obtenção do título de Médico (a).

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 22/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ZULEIDE MARIA IGNACIO
Data: 17/07/2023 21:49:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof^ª Dr^a Zuleide Maria Ignácio – UFFS
Orientadora**

Documento assinado digitalmente
 FELIPE JOSE NASCIMENTO BARRETO
Data: 18/07/2023 10:47:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Ms. Felipe José Nascimento Barreto – UFFS
Avaliador**

Documento assinado digitalmente
 DANIELA ZANINI
Data: 18/07/2023 19:13:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof^ª. Dr^a. Daniela Zanini – UFFS
Avaliador**

Dedico este trabalho aos meus pais, que não
pouparam esforços para que eu pudesse
concluir meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Deus por propiciar a dádiva da vida e poder seguir Seu caminho em prol da Sua Graça. Agradecemos a todo o suporte e a base construída junto com a família, que participou e acompanhou cada passo a um caminho que já trouxe alegrias, realizações, bênçãos, tristeza e frustrações, e que continuem a acompanhar nossa trajetória de camarote. Um agradecimento especial à Prof^a Dr^a Zuleide Maria Ignácio, a qual nos deu orientação e ensinamentos dentro do universo magnífico que é a neurociência, propiciando momentos que serão recordados *a posteriori*. Agradecemos aos nossos amigos e companheiros que nos auxiliam nessa jornada diariamente, dividindo as alegrias, tristezas e tudo que fora propiciado na trajetória dentro da UFFS. Gostaríamos de expressar nossa gratidão a todos que colaboraram para que essa jornada acadêmica fosse possível e que participaram de uma forma ou de outra na construção de nosso ser. O mais sincero “Muito obrigado!”.

“Curar às vezes, aliviar muito frequentemente e confortar sempre –
Oliver Holmes” (Siqueira, 2000).

RESUMO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma doença multifatorial com repercussões na qualidade e esperança de vida, sendo considerado um problema de saúde pública. Nesse aspecto, a privação maternal (PM) é um protocolo animal relacionado ao desenvolvimento de TDM na idade adulta, devido a alterações na circuitaria neuronal e no neurodesenvolvimento. Destaca-se que o TDM é um transtorno de difícil tratamento, com casos refratários aos antidepressivos clássicos e mesmo a outras estratégias farmacológicas. Junto a isso, há a necessidade de um maior tempo para a obtenção de uma resposta terapêutica. Para tanto, urge a necessidade de novas opções terapêuticas. Desse modo, este trabalho propõe avaliar o tratamento realizado com o extrato hidroalcoólico (EHA) da *Aloysia citriodora* em ratos com comportamento tipo depressivo, os quais foram submetidos à PM durante os primeiros dias de vida. Foram avaliados parâmetros comportamentais e marcadores de estresse oxidativo (EO) desencadeados pelo estresse de PM. Os filhotes foram submetidos ao protocolo de PM a partir do primeiro dia, consistindo em PM por 3h ao dia por um período de dez dias. Ao final de sessenta dias de vida, iniciou-se tratamento crônico com o EHA da *A. citriodora* por quatorze dias, sendo realizado o teste de natação forçada e eutanásia para coleta de amostras ao final do tratamento. O protocolo levou a comportamentos tipo depressivo na vida adulta e a aumento dos níveis de mieloperoxidase (MPO) no soro e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em soro e hipocampo. O uso crônico do EHA de *A. citriodora* reverteu o quadro de comportamentos tipo depressivos e reduziu parâmetros do estresse oxidativo. Desse modo, a *A. citriodora* se mostrou uma possibilidade de estratégia terapêutica para o TDM.

Palavras-chave: Transtorno Depressivo Maior; Privação Maternal; Estresse Oxidativo; *Aloysia citriodora*.

ABSTRACT

Major Depressive Disorder (MDD) is a multifactorial disease with repercussions on quality and life expectancy, considered a public health problem. In this regard, maternal deprivation (MD) is an animal protocol related to MDD in adulthood due to changes in neuronal circuitry and neurodevelopment. Notably, MDD is challenging to treat, with cases refractory to classic antidepressants and other pharmacological strategies. Along with this, there is a need for a longer time to obtain a therapeutic response. Therefore, there is an urgent need for new therapeutic options. Thus, this work proposes to evaluate the treatment carried out with the hydroalcoholic extract (EHA) of *Aloysia citriodora* in rats with depressive-like behavior, which were submitted to PM during the first days of life. Behavioral parameters and markers of oxidative stress (OS) triggered by PM stress were evaluated. The pups were submitted to the MD protocol from the first day, consisting of MD for 3 hours a day for ten days. At the end of sixty days of life, chronic treatment with EHA from *A. citriodora* was started for fourteen days, with the forced swimming test and euthanasia being performed to collect samples at the end of the treatment. The protocol led to depressive-like behaviors in adulthood life and increased levels of myeloperoxidase (MPO) in serum, and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum and hippocampus. The chronic use of EHA from *A. citriodora* reversed depressive-like behavior and reduced oxidative stress parameters. Thus, *A. citriodora* proved to be a possible therapeutic strategy for TDM.

Keywords: Major Depressive Disorder; Maternal Deprivation; Oxidative Stress; *Aloysia citriodora*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aloysia Citriodora.....	17
Figura 2 – Desenho experimental do protocolo de PM, tratamentos realizados e testes comportamentais.....	24
Gráfico 1 – Efeitos do estresse de PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da <i>A. citriodora</i> (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg).....	248
Gráfico 2 – Efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da <i>A. citriodora</i> (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória.....	29
Gráfico 3 – Efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da <i>A. citriodora</i> (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre a MPO em soro e hipocampo.....	30
Gráfico 4 – Efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da <i>A. citriodora</i> (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre TBARS em soro e hipocampo.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	4-aminoantipirina
ANOVA	Análise de Variância
CBI	Centro de Bioterismo
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIUCA	Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLC	Cromatografia Líquida em Coluna
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EHA	Extrato Hidroalcolico
ESI	Fonte de Ionização por Eletrospray
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
g	Grama
h	Hora
HOCl	Ácido Hipocloroso
HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
ISRSs	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
Kg	Quilogramas
M	Molar
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPO	Mieloperoxidase
nm	Nanômetro
nM	nanomolar
OMS	Organização Mundial de Saúde

PM	Privação Maternal
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Teste de Campo Aberto
TNF	Teste de Natação Forçada
TDM	Transtorno Depressivo Maior
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNOCHAPECÓ	Universidade Comunitária de Chapecó
UV/Vis	Radiação Ultravioleta e Visível
v	Volume
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
%	porcentagem
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ASPECTOS E USOS GERAIS DA <i>ALOYSIA CITRIODORA</i>	16
1.2	CONSTITUINTES QUÍMICOS DA <i>A. CITRIODORA</i>	18
2	METODOLOGIA	19
2.1	EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E SOLVENTES.....	19
2.2	DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS	19
2.3	COLETA, IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E PREPARAÇÃO DOS VEGETAIS	20
2.4	PREPARAÇÃO DO EXTRATO	20
2.4.1	Teor total de flavonoides.....	21
2.4.2	Quantificação de fenóis totais.....	21
2.5	ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) DO EHA.....	22
2.6	FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO QUÍMICO	22
2.7	AQUISIÇÃO DO COMPOSTO OXALATO DE ESCITALOPRAM.....	23
2.8	GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS	23
2.8.1	Protocolo de privação maternal	23
2.8.2	Testes comportamentais	24
2.9	PARÂMETROS OXIDATIVOS	25
2.9.1	Atividade da mieloperoxidase - MPO.....	25
2.9.2	Análise da peroxidação lipídica - TBARS.....	25
2.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
3	ASPECTOS ÉTICOS.....	26
4	RESULTADOS.....	27
4.1	EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE IMOBILIDADE .	27
4.2	EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO	28
4.3	ATIVIDADE DA MPO E TBARS EM SORO	29
5	DISCUSSÃO	32
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS.....	38

ANEXO A – Carta de aprovação da pesquisa pela CEUA da UNOCHAPECÓ.....	43
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2017), a depressão é uma patologia que ocorre mundialmente, possuindo uma estimativa de população afetada de 3,8%, significando que aproximadamente 280 milhões de indivíduos sofrem com essa doença. Já no Brasil, estima-se que 5,8% da população seja acometida pela doença, totalizando cerca de 11 milhões de indivíduos, sendo o primeiro colocado na América do Sul em percentual e total de casos (WHO, 2017). Um fator a ser considerado com maior atenção é a probabilidade existente do quadro depressivo grave em levar ao suicídio, descrito como principal causa de morte de jovens entre 15 e 29 anos. Acerca do tratamento, tem-se conhecimento de que em países de baixa renda mais de 75% das pessoas acometidas por transtornos mentais não recebem o tratamento adequado para a sua doença. Nesse âmbito, as barreiras para o atendimento consistem na falta de recursos, na indisponibilidade de profissionais treinados e o estigma social que envolve a temática das condições psiquiátricas. Além disso, há o diagnóstico errôneo de depressão que reflete em indivíduos saudáveis que recebem o tratamento indevido e pessoas doentes que não possuem diagnóstico (WHO, 2021).

O transtorno depressivo maior (TDM) caracteriza-se como uma síndrome de distúrbio no humor, metabolismo, cognição e motivação. Diferentes hipóteses são analisadas, visando a elucidação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na disfunção cognitiva descrita nas pessoas com o transtorno. As vias neuroinflamatórias consistem em um processo que desempenha importante influência na patologia. Ademais, foi relatado hipoatividade no córtex pré-frontal de indivíduos que possuem TDM, sendo que as conexões entre estruturas corticais e subcorticais quando anormais colaboram em déficits na função executiva, atenção, memória e velocidade de processamento (PAN et al., 2019).

A privação maternal (PM) é um protocolo experimental animal que emerge como um fator de risco para o desenvolvimento de TDM na idade adulta, devido aos fatores estressores desencadeados na infância. O protocolo mimetiza os efeitos que acontecem em indivíduos humanos que sofrem diversos traumas estressantes na infância. O estresse na infância modula a neuroplasticidade e o neurodesenvolvimento do cérebro jovem, desencadeando assim uma maior suscetibilidade ao transtorno (IGNÁCIO et al., 2014; IGNÁCIO et al., 2017).

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidos constantemente pelos tecidos do corpo, principalmente na matriz mitocondrial durante a fosforilação oxidativa. Fisiologicamente, tais ERO são eliminados pelos mecanismos antioxidantes

enzimáticos e não-enzimáticos. Sob condições patológicas, há uma mudança do estado antioxidante para o estado pró-oxidativo (DINIZ et al., 2018). Esse distúrbio no equilíbrio entre a geração de ERO e sua extinção por antioxidantes é denominado de estresse oxidativo, podendo ser resultante de diminuição da defesa antioxidante ou falha na reparação de danos oxidativos (LUCCA et al., 2009), sendo um fenômeno capaz de propiciar danos celulares (KOROVESIS; RUBIO-TOMÁS; TAVERNARAKIS, 2023) por meio de inativação enzimática, peroxidação lipídica e modificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (LUCCA et al., 2009).

Evidências demonstraram que o TDM é um distúrbio inflamatório, demonstrado pelo envolvimento de células T e monócitos ativados e sabe-se que as respostas inflamatórias são acompanhadas por indução das vias de estresse oxidativo (MAES et al., 2011). Dessa forma, demonstrou-se que a patogênese da depressão está associada ao estresse oxidativo, sendo evidenciada por fatores bioquímicos, genéticos, farmacológicos, estudos terapêuticos pré-clínicos e ensaios clínicos (SHAHZAD et al., 2014; WIGNER et al., 2018).

O cérebro mostra-se vulnerável a ERO devido sua função de metabolizar 20% do total de oxigênio do corpo. Entretanto, o órgão possui uma quantidade limitada de capacidade antioxidante. Sendo assim, em situações em que a geração de radicais livres excede a capacidade de defesa antioxidante, o estresse oxidativo pode levar a degradação da membrana, disfunção celular e apoptose (LUCCA et al., 2009).

A mieloperoxidase (MPO) é a enzima presente exclusivamente nas células do sistema imune inato e tem como função catalisar a reação: $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow OCl^- + H_2O$, gerando ERO necessárias ao combate a patógenos (CANNIZZO et al., 2011). Essa via de atividade funciona como parâmetro de inflamação ativa, sendo associada a progressão de várias doenças (MELLO et al., 2018). Com relação às substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), é método laboratorial utilizado como marcador indireto e inespecífico do estresse oxidativo (NOBIS; ZALEWSKI; WASZKIEWICZ, 2020).

1.1 ASPECTOS E USOS GERAIS DA *ALOYSIA CITRIODORA*

A *Aloysia citriodora* é uma planta nativa da América do Sul e possui ampla distribuição no Norte da África e Sul da Europa. Foi introduzida no continente europeu pelos espanhóis e portugueses no século XVII. Em Portugal é chamada de limonete, recebendo,

todavia, o nome de bela-luísia na região de Algarve. No Brasil, recebe diversos nomes populares, dependendo da região, como cidró, falsa-erva-cidreira, lúcia-lima, limão-verbena e erva-luisa (LORENZI; MATOS, 2002; BARAMSOLTANI et al., 2018).

A *A. citriodora* possui um uso tradicional que remonta ao século XVII, sendo valorizada como planta medicinal pela cultura inca. Os *Kallawayas*, curandeiros itinerantes dos Andes, a utilizavam com os nomes *quechua* ou *waripankara* para tratar problemas digestivos, espasmos, bronquite e doenças cardíacas. Além disso, suas folhas são utilizadas em infusões refrescantes e na indústria de perfumes. No Egito, também, é tradicionalmente utilizada por suas propriedades medicinais e também é comercializada na perfumaria devido à alta concentração de citral e limoneno em suas folhas (GIRAULT, 1987; IBRAHIM; MOHAMED; KHALID, 2014; ELECHEOSA, 2017).

No Brasil, a *A. citriodora* é comumente cultivada em jardins e hortas, sendo utilizada principalmente para fins medicinais e alimentícios (LORENZI; MATOS, 2008). Suas folhas são preparadas em diversos locais do país para o tratamento de resfriados, gripe, problemas nervosos, acne e como inseticida, bactericida, tônico, antiespasmódico e carminativo (LORENZI; MATOS, 2008; MAIA; FRANCISCO, 2001; NEGRELLE et al., 2007; MERÉTIKA; PERONI; HANAZAKI, 2010).

Figura 1 – *Aloysia Citriodora*



Fonte: Wikipedia (2010)

1.2 CONSTITUINTES QUIMICOS DA *A. CITRIODORA*

Com relação a sua composição, a *A. citriodora* contém uma variedade de compostos químicos em diferentes partes da planta. Extratos metanólicos, etanólicos e aquosos da planta apresentam vários flavonoides. O óleo essencial é composto principalmente por monoterpenos, monoterpênicos, sesquiterpenos, sesquiterpenoides e alguns álcoois graxos (IBRAHIM; MOHAMED; KHALID, 2014; BARAMSOLTANI et al., 2018). No óleo essencial, são encontrados compostos como geranial, neral, limoneno e citral (FREDDO, 2016). Nas folhas jovens, são comumente encontrados β -pineno, acetato neral e transcalameneno (IBRAHIM; MOHAMED; KHALID, 2014). Além disso, nas folhas e flores da *A. citriodora*, foram isolados componentes como limoneno, 1,8-cineol, geranial, neral, β -guanina, espesolenol e óxido de cariofileno (SHAHHOSEINI; HOSSENEI; GHORBANPOUR, 2014).

O extrato aquoso de *A. citriodora* apresentou efeitos sedativos no teste de campo aberto em ratos, potencializados pelo Diazepam. Esses efeitos foram sensíveis ao antagonismo por flumazenil, indicando a ativação de receptores centrais do sistema gabaérgico. O extrato também bloqueou de forma não competitiva a ação da fenilefrina nos vasos deferentes através dos receptores α -adrenérgicos e induziu inotropismo negativo no coração. Essas propriedades sedativas do tipo benzodiazepínico, inotropismo negativo e efeito antiespasmódico justificam seu uso popular como auxiliar no tratamento da ansiedade e cólicas abdominais (RAGONE, 2010).

A artemitina e hesperidina, componentes da *A. citriodora*, são substâncias com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que estão associadas às propriedades antidepressivas (GUPTA; GUPTA; VARSHNEY, 2020). Um estudo mostrou o efeito antidepressivo dos extratos etanólico, clorofórmico e aquoso de *A. citriodora* em modelos animais, com resultados positivos nos testes de natação forçada e suspensão da cauda (ERAM et al., 2012). Além disso, um estudo utilizando *Aloysia gratissima*, uma espécie do mesmo gênero, também demonstrou efeito antidepressivo nos mesmos testes (ZENI et al., 2013).

A partir disso, optou-se por investigar possíveis alterações no hipocampo e sangue periférico em ratos adultos que foram submetidos à PM nos primeiros dias de vida e suas relações com estresse oxidativo. Por conseguinte, avaliou-se o efeito do tratamento com extrato da *A. citriodora* sobre parâmetros comportamentais e oxidativos em ratos submetidos à estresse de PM.

2 METODOLOGIA

2.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E SOLVENTES

O equipamento Bruker® modelo DRX 400, presente na Universidade Federal do Paraná (UFPR), foi utilizado nas análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear de prótons (400 MHz) e de carbono (100 MHz) por intermédio da orientação do Prof. Dr. Andersson Barison. O 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), presente na a Universidade Estadual Paulista (UNESP; Campus Litoral) foi utilizado na identificação das substâncias em espectrometria de massas por meio de análise de infusão direta sob orientação do Prof. Dr. Wagner Vilegas. O fotômetro digital semiautomático (BioSystems®, modelo BTS 310) foi designado para a realização dos métodos espectrofotométricos de Radiação Ultravioleta e Visível (UV/Vis).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), método utilizado para as análises cromatográficas, foi realizada por meio do cromatógrafo Varian® Pro-Star dotado de um injetor manual de alça de 20 µl, de um gradiente ternário de bombas e de um UV/Vis e da coluna Kromasil® ODS (5µm) fase reversa C-18 (250 x 4,5 mm). O verbascosídeo obtido da empresa Sigma-Aldrich® (USA) foi definido como padrão analítico.

A filtração de amostras e solventes contou com a utilização de filtros Micropore® de teflon de 0,45 µm. As análises em CLAE foram realizadas com os solventes grau HPLC (MeOH, EtOH, H₃PO₄, AcOH e HCO₂H) adquiridos da J.T. Baker® (Goiânia, GO, Brasil). Enquanto a água procede do ultrapurificador de água Milli-Q A10 Gradiente®. As análises fitoquímicas utilizaram dos solventes MeOH, EtOH, AcOEt, n-hexano, DCM, e CHCl₃ adquiridos na Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

2.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS

O delineamento desse estudo pode ser definido como pesquisa quantitativa analítica, de natureza experimental. O Laboratório de Farmacognosia, da Universidade Comunitária de

Chapecó (UNOCHAPECÓ) foi responsável pela realização da preparação do material vegetal, produção dos extratos.

A concretização do experimento com o uso de animais se deu no Centro de Bioterismo (CBI) da UNOCHAPECÓ com registro no Conselho Regional de Medicina Veterinária de Santa Catarina (CRMV/SC) n. SC-08771-PJ, contando com a supervisão da Médica Veterinária Responsável, Natacha Trevisani (CRMV/SC-nº4815SC). Tal centro apresenta registro no o Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA) acerca de sua infraestrutura de criação e experimentação, além de seguir as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, SC serviram de local para análise dos tecidos cerebrais.

2.3 COLETA, IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E PREPARAÇÃO DOS VEGETAIS

A *Aloysia citriodora* Palau (Verbenaceae) foi coletada em Chapecó (SC) (27° 05' 37" S e 52° 39' 58" O), durante os meses de janeiro e março de 2018. Para a elaboração de exsicata, no momento de coleta reservou-se uma amostra (em torno de 30 cm) englobando folhas e inflorescências visando sua identificação botânica. Esse material foi identificado subsequentemente pelo Prof. Adriano Dias de Oliveira, curador do Herbário da UNOCHAPECÓ, local onde foi depositada uma exsicata (n. 3777). O restante da planta (aproximadamente 1000g) foi redirecionado ao Laboratório de Farmacognosia da UNOCHAPECÓ. Adiante, o material vegetal foi reduzido a pequenos fragmentos e submetido à secagem em temperatura ambiente (± 25 °C), sendo protegido da umidade e da luz direta. Dando continuidade, a droga vegetal desidratada foi triturada no moinho de facas (Ciemlab®, CE430), passou por seleção em tamis 425 μm (35 Tyler/Mesh), foi identificada e armazenada ao abrigo da luz.

2.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O EHA de *Aloysia citriodora* foi obtido por maceração (3 dias) com o material vegetal dessecado (400g), fazendo uso do etanol (70% v/v; 3:1) (AZWANIDA, 2015). Foi realizada

filtração por Büchner e, em seguida, o extrato foi evaporado sob pressão reduzida, liofilizado, pesado e estocado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4.1 Teor total de flavonoides

A quantificação dos flavonoides em EHA foi gerada de acordo com Woisky e Salatino (1998), com adequações. O processo consistiu em 1 mL de EHA (1000 $\mu\text{g/mL}$) sendo adicionado a 1 mL de Cloreto de Alumínio (AlCl_3) (2% em MeOH) e após 60 min realizou-se leituras do espectrofotômetro (425 nm), sendo produzida uma curva de calibração protegida da luz direta e umidade em temperatura ambiente ($\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sequencialmente, a planta vegetal desidratada passou por trituração no moinho de facas (Ciemlab®, CE430), seleção em tamis 425 μm (35 Tyler/Mesh), identificação e armazenamento ao abrigo da luz. Foi utilizado o padrão de quercetina diluída em metanol (10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$), e as leituras foram realizadas em triplicata. Miligramas por grama de extrato foi a unidade utilizada para quantificar os flavonoides.

2.4.2 Quantificação de fenóis totais

Os componentes fenólicos presentes em EHA foram determinados segundo o método de Folin-Ciocalteu modificado por Singleton e Rossi (1965). A diluição do EHA ocorreu em álcool etílico nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Foram adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a cada 0,5 mL de extrato nas diferentes concentrações. Após 3 minutos, 1 mL de solução de Na_2CO_3 a 10% foi adicionado e a mistura armazenada por 1h. Foram realizadas triplicatas das análises e a absorbância mensurada a 725 nm. A quantificação de fenóis totais foi determinada por meio da interpolação da absorbância das amostras em uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expressa como mg de EAG (Equivalentes de Ácido Gálico) por g de extrato.

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

Realizou-se, de acordo com Apáti et al. (2006), análises cromatográficas utilizando um 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) a uma temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Utilizamos dois sistemas de solventes: H₂O: AcOH (40:1 v/v) (solvente A) e CH₃CN (solvente B). A análise foi conduzida a uma temperatura de aproximadamente 22°C com uma vazão de 1mL/min. O gradiente utilizado consistiu em 86% de A por 15 min, 65% de A por 30 min e 100% de B por 2 min. A detecção foi realizada a 360 nm e os resultados foram comparados com padrões externos autênticos por meio de tempos de retenção e espectros de UV.

2.6 FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO QUÍMICO

A amostra de EHA (50 g) foi diluída em 500 mL de água destilada em um béquer e agitada mecanicamente. Em seguida, a solução foi transferida para um funil de separação e realizaram-se 10 partições com solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila, diclorometano e n-butanol). As frações resultantes foram concentradas em um rotavapor sob pressão reduzida, pesadas para determinar o rendimento e armazenadas em um freezer.

As frações foram aplicadas em uma placa de gel de sílica 60 F254 Merck® (lote HX772843) para a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando 20 µL. O sistema eluente consistiu em uma mistura dos solventes AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10 v/v). Após a aplicação, as placas foram secas a temperatura ambiente e as bandas foram observadas em 366 nm utilizando uma câmara de UV/Vis. Em seguida, as placas foram reveladas com uma solução de cloreto férrico a 1% em MeOH (m/v) (WAGNER; BLADT, 1996). A fração que apresentou bandas com maior positividade para compostos fenólicos foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica.

Para fracionamento, foi dissolvida uma amostra da fração de acetato de etila (AcOEt, 4g) em hexano e a submetida à Cromatografia Líquida em Coluna (CLC), usando gel de sílica (Merck®) como fase estacionária e hexano e AcOEt como eluentes. A eluição da coluna foi feita em alíquotas de 5 mL, com um aumento de 10% na polaridade do eluente a cada etapa,

até chegar a 100% de AcOEt. As subfrações foram agrupadas por semelhança na CCD, utilizando AcOEt:MeOH:H₂O (100:13,5:10 v/v) como fase móvel, e foram analisadas em uma câmara de UV/Vis a 366 nm.

2.7 AQUISIÇÃO DO COMPOSTO OXALATO DE ESCITALOPRAM

Adquiriu-se 1000 gramas de oxalato de escitalopram da Laborsan Farmácia de Manipulação Ltda, fabricado pela empresa Lepuge Insumos Farmacêuticos Ltda, sediada em São Bernardo do Campo, estado de São Paulo, Brasil. O composto possui pureza >95% e está na forma sólida, em pó, com uma quantidade de 1000 gramas.

2.8 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS

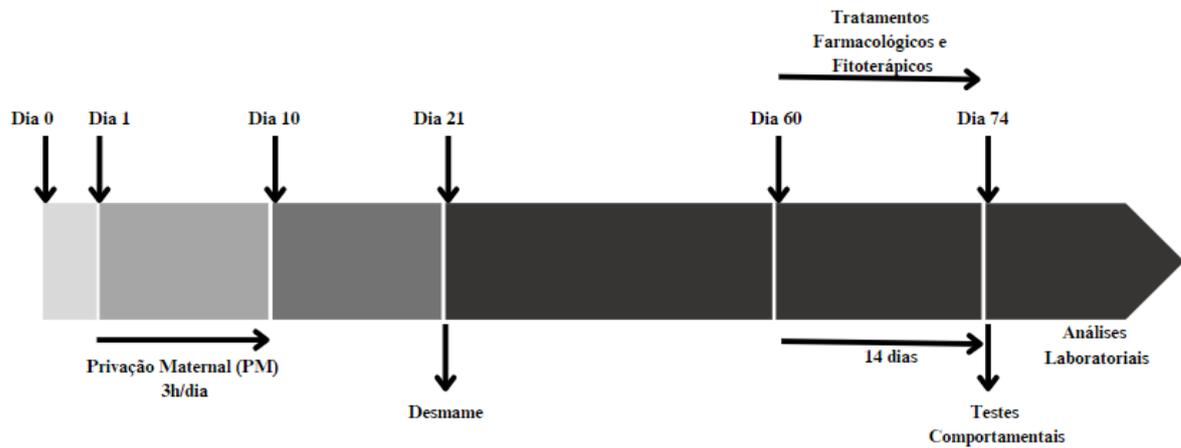
2.8.1 Protocolo de privação maternal

Os filhotes de ratos heterogêneos da linhagem Wister foram submetidos à PM por 3 horas diárias nos primeiros 10 dias após o nascimento. A PM consistiu na remoção dos filhotes da caixa, mantendo a mãe na presença do odor dos filhotes. Os animais não privados (grupo de controle) permaneceram na gaiola original com a mãe. O desmame dos animais ocorreu somente no 21º dia após o nascimento dos filhotes.

Foram formados dois grupos experimentais: Grupo PM (dividido em três subgrupos) e grupo controle Sem Estresse (SE). Após atingirem 60 dias de idade, os ratos foram subdivididos em subgrupos (n = 10) e receberam tratamento crônico por 14 dias com as seguintes substâncias: Escitalopram na dose de 10 mg/kg (como controle positivo, antidepressivo clássico) e extrato hidroalcoólico (EHA) de *A. citriodora* na dose de 30 mg/kg, conforme os estudos de Gomes *et al.* (2022). Os grupos controle para os tratamentos receberam solução salina. A dose de escitalopram foi selecionada com base em estudos anteriores (IGNÁCIO *et al.*, 2018). A Figura 1 a seguir ilustra o desenho experimental. A administração dos extratos e medicamentos foi realizada oralmente através do método de gavagem. Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos considerando o estresse, o

tratamento com escitalopram e o extrato de *A. citriodora*: Controle + Salina, PM + Salina, PM + escitalopram e PM + *A. citriodora*.

Figura 2 – Desenho experimental do protocolo de PM, tratamentos realizados e testes comportamentais.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

2.8.2 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados em um único período da manhã (8:00 - 12:00), começando 60 minutos após a última administração de cada tratamento. Um observador cego em relação aos grupos experimentais conduziu todos os testes comportamentais.

O comportamento depressivo foi avaliado utilizando o Teste de Natação Forçada (TNF), conforme descrito por Porsolt et al. (1977), com 10 animais por grupo (n=10/grupo). A atividade motora exploratória foi avaliada através do Teste de Campo Aberto (TCA), conforme descrito por Réus et al. (2013), com 10 animais por grupo (n=10/grupo). Para a análise dos marcadores do estresse oxidativo, os animais foram eutanasiados por decapitação e o cérebro foi extraído. O hipocampo foi separado com base na descrição histológica de Paxinos e Watson (1986).

2.9 PARÂMETROS OXIDATIVOS

2.9.1 Atividade da mieloperoxidase - MPO

A MPO é uma enzima heme produzida por mediadores inflamatórios e liberada pelos leucócitos no local da lesão, refletindo a ativação de neutrófilos e linfócitos. Ela catalisa a reação de íons cloreto com H_2O_2 , gerando ácido hipocloroso (HOCl). Na presença de H_2O_2 , a MPO também catalisa o acoplamento oxidativo do fenol e 4-aminoantipirina (AAP), formando a quinoneimina, que possui absorvância máxima em 492 nm (Suzuki et al., 1983). A atividade de MPO foi avaliada utilizando um sistema de peroxidase modificado, onde a amostra de soro foi misturada com AAP e H_2O_2 , incubada a 37 °C por 30 minutos e medida espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos em μM de quinoneimina por mg de proteína produzida em 30 minutos ($\mu Mq/mg/30min$).

2.9.2 Análise da peroxidação lipídica - TBARS

As lipoperoxidações são reações rápidas resultantes da quebra de ácidos graxos poliinsaturados, geralmente quantificadas por meio de TBARS, sendo o malondialdeído (MDA) seu principal componente, detectado principalmente pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Jentsch et al., 1996). Para medir o MDA, as amostras de soro foram misturadas com 55 μL de água destilada, 100 μL de ácido ortofosfórico (0,2 M) e 25 μL TBA (0,1 M). Após incubação a 37°C, a leitura espectrofotométrica foi realizada para detectar o produto rosa formado, com absorção medida em 532 nm. Os resultados foram expressos em nM de MDA/mL de soro.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) one-way, seguido do teste post-hoc de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O software Statistica 7.0 foi destinado a realização das análises estatísticas.

3 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de título “Efeito antidepressivo e antioxidante da espécie *Aloysia citrodora* em ratos adultos submetidos à privação maternal na infância” constitui um subprojeto vinculado a um projeto maior intitulado “Efeito antidepressivo, ansiolítico e neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *Aloysia citriodora* em animais submetidos a estresse na infância e na vida adulta”. Esse foi submetido a COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) sob o protocolo de nº 005/CEUA/2021 e foi aprovado pela CEUA da UNOCHAPECÓ – local no qual os protocolos dos extratos da planta e dos experimentos com os animais foram realizados na data 29/07/2021.

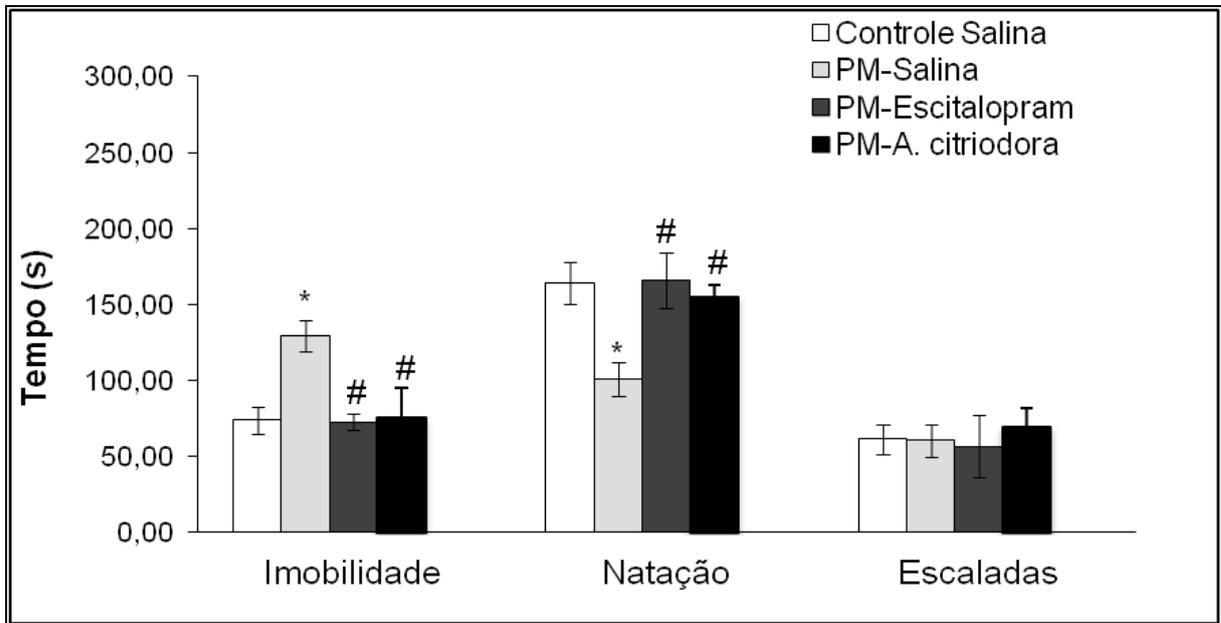
4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE IMOBILIDADE

A PM e os tratamentos com o EHA da *A. citriodora* (30 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) foram avaliados pelo teste de natação forçada e tem seus efeitos ilustrados no gráfico 1. Acerca da imobilidade no protocolo de natação forçada, a ANOVA *one-way* apontou uma significativa interação entre os grupos privados maternalmente e o grupo sem estresse e entre os tratamentos ($F= 5,3377$; $p: 0,004727$). Foi demonstrado pelo teste *Post hoc* Tukey que a PM elevou significativamente o tempo de imobilidade ($p < 0,02$) no teste de natação forçada. Foi verificada a reversão do efeito da PM após tratamento com *A. citriodora* e escitalopram, ambos com ($p < 0,02$).

Na ANOVA, observou-se que a PM sofreu uma significativa diminuição no tempo de natação ($F= 5,1787$; $P < 0,005471$). Enquanto, no teste de *Post hoc* de Tukey, a PM apresentou um tempo menor de natação quando comparada ao grupo controle salina ($p < 0,02$), ao grupo PM tratado com escitalopram ($p < 0,02$), e em relação ao grupo PM tratado com *A. citriodora* ($p < 0,04$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no teste de escalada.

Gráfico 1 – Efeitos do estresse de PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg).

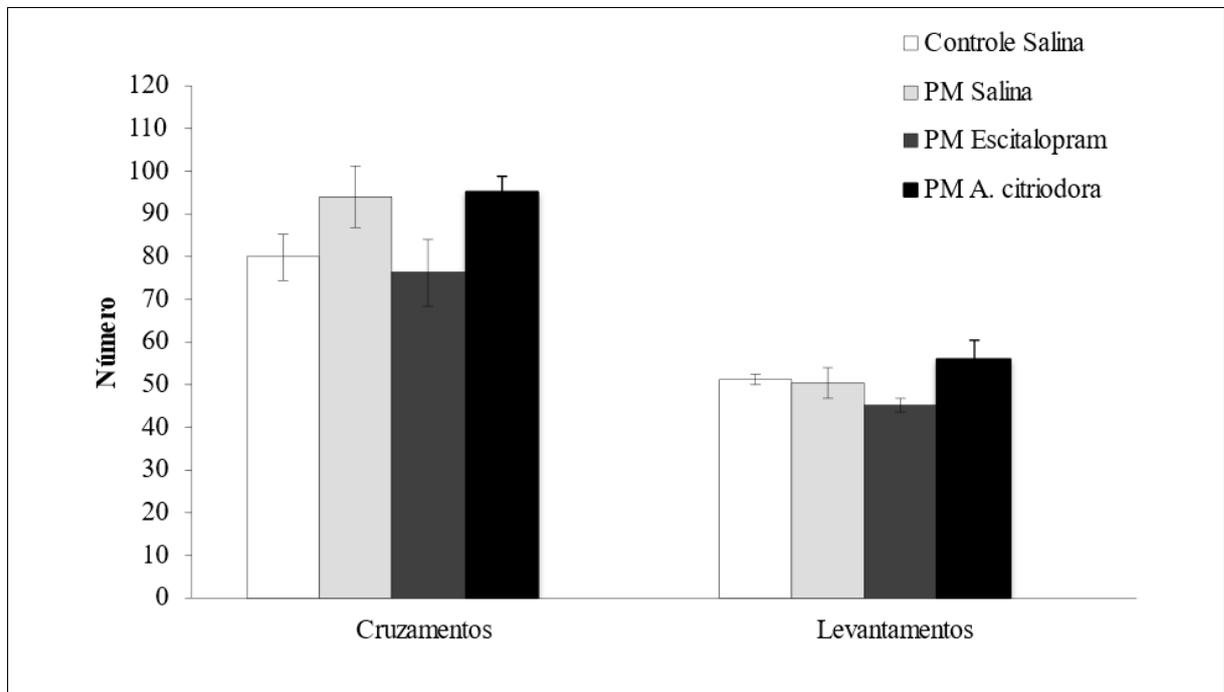


Fonte: Elaborado pelos autores (2023). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Parâmetro de mobilidade: *diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,05$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$). Parâmetro de natação: *diferença estatística entre o Controle Salina 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

A PM e os tratamentos com o EHA da *A. citriodora* (30 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) foram avaliados pelo TCA e tem seus efeitos ilustrados no gráfico 2. Na análise, a ANOVA *one-way* não indicou interação significativa entre os grupos de PM e os grupos sem estresse. A avaliação da PM e dos tratamentos foi realizada pelos valores de cruzamentos ($F=2,40$; $p > 0,05$) e levantamentos ($F=2,11$; $p > 0,05$) e não foram constatadas alterações significativas na atividade locomotora.

Gráfico 2 – 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.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média.

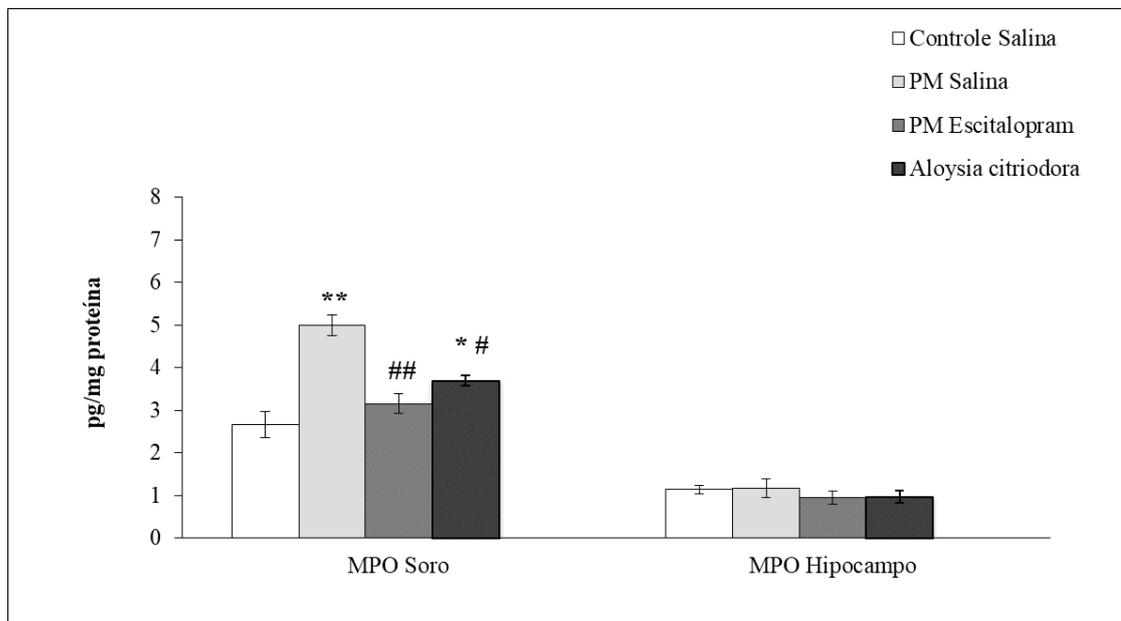
4.3 ATIVIDADE DA MPO E TBARS EM SORO

Os efeitos da PM assim como do tratamento com EHA da *A. citriodora* (30 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos níveis de MPO e TBARS presente em hipocampo e soro, estão ilustrados, respectivamente, no gráfico 3 e gráfico 4. Na análise, a ANOVA não indicou interação significativa entre os grupos presentes da avaliação de níveis de MPO do hipocampo ($F= 0,4689$; $p > 0,05$). Diferentemente, ANOVA apontou significativa interação entre os grupos privados matematicamente e o grupo sem estresse e entre os tratamentos tanto nos valores de MPO séricos ($F= 29,0810$; $p < 0,0001$), TBARS sérico ($F= 4,2379$; $p < 0,05$) e TBARS no hipocampo ($F= 4,42067$; $p < 0,05$).

O teste *Post hoc* de Tukey mostrou que a PM não induziu aumento significativo dos níveis de MPO ($p > 0,05$) em hipocampo, contudo mostrou aumento com significância estatística a nível de soro ($p < 0,001$). Já pelo mesmo teste, o TBARS apresentou aumento significativo em hipocampo e soro ($p < 0,05$). A *A. citriodora* ($p < 0,05$) e o escitalopram ($p < 0,01$) reverteram os níveis elevados de MPO, induzidos pela PM no soro. Entretanto, a nível de hipocampo a redução não apresentou significância estatística.

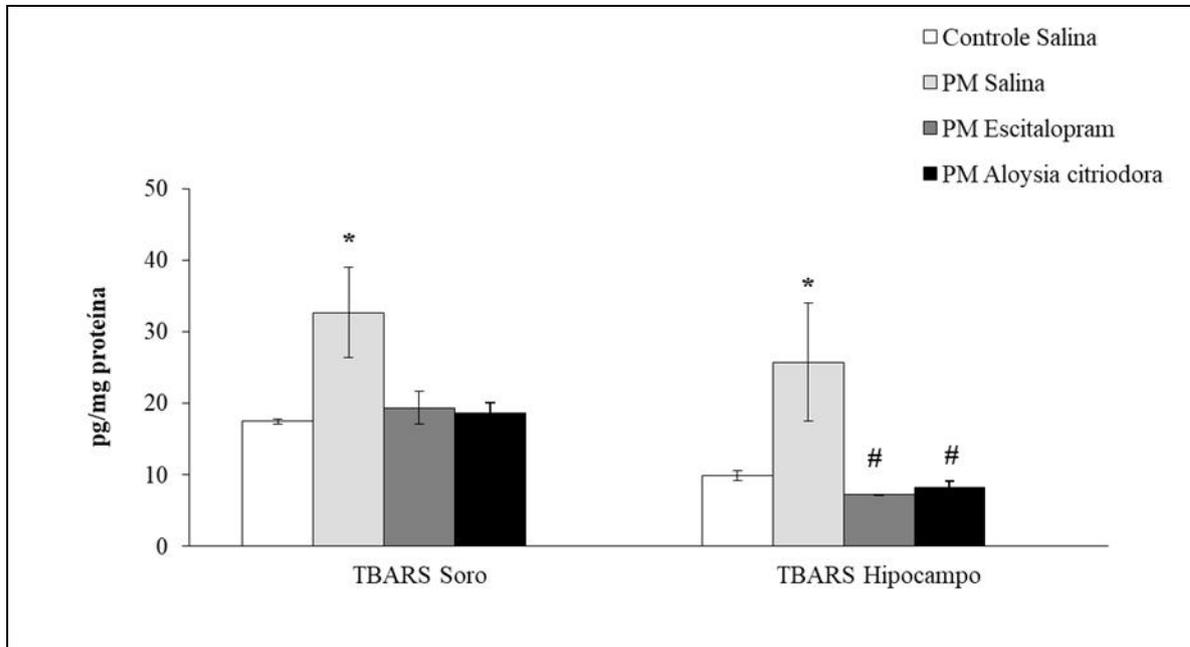
Com relação ao TBARS, a *A. citriodora* ($p < 0,05$) e o escitalopram ($p < 0,05$) reverteram os níveis elevados, induzidos pela PM no hipocampo. Apesar de não apresentar significância estatística, houve redução dos níveis de TBARS em soro nos grupos com tratamentos (escitalopram - 19,36128; *A. citriodora* - 18,63028 [$p = 0,06023$]) com relação ao grupo de PM Salina.

Gráfico 3 – Efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcoólico da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre a MPO em soro e hipocampo.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. #diferente do PM Salina ($p < 0,001$); *diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,05$); **diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,001$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$); ##diferente do PM Salina ($p < 0,01$).

Gráfico 4 – Efeitos da PM e dos tratamentos com o extrato hidroalcolólico da *A. citriodora* (30 mg/kg), escitalopram (10 mg/kg) sobre TBARS em soro e hipocampo.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023). Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. *diferença estatística entre o Controle Salina e o PM Salina ($p < 0,05$); #diferente do PM Salina ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A depressão é o principal transtorno psiquiátrico que acomete a população mundial, sendo considerado um transtorno incapacitante. Tanto fatores socioeconômicos, como biológicos podem estar associados à presença do transtorno (MALHI; MANN, 2018; WHO, 2021). O aparecimento do TDM pode ocorrer de forma gradual ou abrupta, tendo como principais sinais e sintomas a anedonia e humor depressivo, podendo estar presentes sentimentos de culpa e/ou inutilidade, alteração sono-vigília, entre outros (MALHI; MANN, 2018; SHIMADA et al., 2014). O diagnóstico de TDM é dificultado por diversas razões, desde estigmas, medo do uso de medicações ou o encaminhamento para um psiquiatra. Do mesmo modo, o tratamento é desafiador, tendo em vista diferentes respostas para o mesmo tratamento, necessitando assim de troca de medicação (MALHI; MANN, 2018; MONDAL; FATIMA, 2018).

Apesar de ser bastante estudada, ainda não foi possível definir um mecanismo específico que explique de forma satisfatória o surgimento do TDM. Sabe-se que os transmissores monoaminérgicos, serotonina, noradrenalina e dopamina, estão associados à fisiopatologia da depressão, servindo como importantes alvos terapêuticos (CHEN, 2010; MALHI; MANN, 2018; YU). Contudo, as medicações levam em torno de 2 a 4 semanas para fazer efeito, o que colocou em xeque, unicamente a hipótese monoaminérgica para a explicação da fisiopatologia do TDM (PRICE; DUMAN, 2019). Além disso, há alteração neuronal em pacientes acometidos por depressão, já que análises *post mortem* comparativas entre pessoas com e sem depressão mostraram redução em volume de hipocampo em indivíduos com TDM (YU; CHEN, 2010; PRICE; DUMAN, 2019). Isso demonstra que pacientes com depressão possuem neuroregeneração e neuroplasticidade reduzida, devido aos fatores estressores pelos quais as células neuronais passam, como o próprio processo inflamatório existente decorrente de fatores ambientais (PRICE; DUMAN, 2019).

O estresse na infância surge como um fator estressor durante a juventude que tem a capacidade de alterar a neuroplasticidade cerebral, correlacionando com uma maior possibilidade de desenvolvimento de depressão na idade adulta (IGNÁCIO et al., 2014; IGNÁCIO et al., 2017). Esse processo ocorre devido a possíveis alterações nas circuitarias neurais e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (BRUNONI; LOPES; FREGNI, 2008; YU; CHEN, 2010; DIMITRIADIS et al., 2019). O cérebro, durante a juventude, não é tão responsivo ao eixo HHA, levando somente a alterações se o estímulo estressor do ambiente

for muito intenso (IGNÁCIO et al., 2014; IGNÁCIO et al., 2017). Esse processo é essencial para que o cérebro não tenha o seu desenvolvimento comprometido. Desse modo, percebeu-se que a privação maternal está associada a uma maior ineficácia terapêutica (IGNÁCIO et al., 2017).

O extrato hidroalcoólico de *A. citriodora* e o antidepressivo escitalopram reduziram os comportamentos do tipo depressivos observados neste trabalho, os quais foram observados nos parâmetros de mobilidade no teste de natação forçada em ratos adultos submetidos a PM nos primeiros dias de vida. Sabe-se da dependência dos animais com sua mãe no período neonatal, o que torna tal característica fundamental ao processo de desenvolvimento neuronal (IGNÁCIO et al., 2017).

Dentre os fármacos utilizados no tratamento de TDM, ansiedade e outros distúrbios psiquiátricos, o escitalopram caracteriza-se como um fármaco tradicional de uso recorrente. O fármaco tem como premissa a manutenção da serotonina na fenda sináptica, sendo classificado como um dos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs). O escitalopram consegue trazer alívio clínico durante o TDM através de alterações na função da serotonina e da sinalização celular. Apesar de seu uso difundido, existem indivíduos resistentes, tanto aos ISRSs, quanto a outras estratégias terapêuticas, constatação que instiga investigação acerca de outros tratamentos para o TDM. Apesar de tal modulação sináptica de serotonina não ter seu processo integralmente esclarecido, foi demonstrado em roedores que o escitalopram foi capaz de reduzir a inflamação aguda (HERSEY, et al., 2021). Evidências demonstraram que a depressão apresenta um distúrbio inflamatório (MAES et al., 2011) e o estresse oxidativo está relacionado com aumento de marcadores inflamatórios (MELLO et al., 2018), além de que a inflamação tem influência na resposta clínica após uso dos ISRSs (HERSEY, et al., 2021). Nesse contexto, acredita-se que a *A. citriodora* pode ser um agente antidepressivo devido sua ação anti-inflamatória.

O teste de natação forçada e o teste do campo aberto foram realizados nesse estudo com o intuito de avaliar os impactos da PM e dos tratamentos. O teste de natação forçado é composto pelos parâmetros de tempo de imobilidade, natação e escalada. Inúmeros estudos sugerem que o teste se mostra capaz de propiciar uma avaliação acerca de substâncias potencialmente antidepressivas e as respostas comportamentais de animais submetidos a um protocolo de estresse crônico (ARAUCHI et al., 2018; HARAGUCHI et al., 2018). No teste de natação forçada foram observadas neste estudo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, principalmente acerca do tempo de imobilidade e natação. O teste de campo aberto tem a capacidade de avaliar a possibilidade de ocorrência de efeitos sedativos devido

ao tratamento por meio da análise da atividade geral exploratória (GOUD te al., 2009). Nesse estudo não foram apontadas diferenças significativas entre os grupos diferentes.

Na avaliação da ANOVA, o grupo PM teve o indicador de parâmetro de imobilidade aumentado em relação ao grupo controle. Os tratamentos com escitalopram e *A. citriodora* reduziram significativamente o tempo de imobilidade dos animais privados matematicamente. Dessa maneira, os grupos tratados apresentaram diminuição dos comportamentos tipo depressivos e tiveram comportamento similar ao do grupo sem estresse, corroborando com a literatura científica atual. Entre o grupo de PM e o grupo controle, a ANOVA revelou uma diferença estatística significativa entre o tempo de natação. O grupo PM apresentou uma redução significativa do tempo de natação e os tratamentos com escitalopram e *A. citriodora* aumentaram significativamente o tempo de natação dos animais PM, em relação ao grupo PM sem tratamento. Esses resultados obtidos nos componentes do teste de natação forçada mostraram que o EHA de *A. citriodora* (30 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) obtiveram ação antidepressiva semelhante ao grupo sem estresse, sendo ambos capazes de diminuir os comportamentos tipo depressivos desencadeados pelo estresse da PM. Tais constatações vão ao encontro da literatura científica atual, quando se analisa a ação em mecanismos biológicos relevantes na proteção neuronal e redução da inflamação promovida pelo escitalopram em pesquisas com modelo animal (WOLKOWITZ et al., 2011; MUNZER et al., 2013; SEO et al., 2017).

Uma característica das substâncias antidepressivas encontra-se na possibilidade de esses induzirem um efeito sedativo que influencie no comportamento de mobilidade dos animais. Nesse estudo, a ANOVA não evidenciou diferença estatística entre os grupos, demonstrando que não houve sedação ou aumento da excitabilidade motora, provocadas pelo tratamento com o extrato de *A. citriodora* e com o escitalopram. Tal observação nos mostra relevante devido ao fato dos efeitos não sedativo e não excitatório, não causarem prejuízos na capacidade de luta e tentativa de fuga do ambiente, observadas no experimento.

O encéfalo é o órgão com maior atividade celular do organismo, maior consumo de oxigênio e menor defesa antioxidante. Desse modo, ele pode se encontrar com alta presença de espécies reativas ao oxigênio, como subprodutos da respiração celular. Esses subprodutos são capazes de induzir dano tecidual a partir de sua ligação desde moléculas de membrana até o DNA nuclear. Tendo isso em vista, o balanço entre o processamento dessas substâncias em substâncias menos reativas é fundamental para a preservação do tecido e a redução de um estado inflamatório. Em doenças como a depressão, ocorre um desbalanço entre as espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante celular, levando a inflamação, lesão tecidual,

sinalização neural anormal, e em última instância, morte neuronal (MAES et al., 2013; NOBIS; BHATT; NAGAPPA; PATIL, 2020; ZALEWSKI; WASZKIEWICZ, 2020).

A mieloperoxidase é uma enzima heme presente em células do tecido nervoso e em neutrófilos, tendo o aumento de sua expressão relação com uma maior atividade inflamatória e neurodegenerativa (GAŁECKI et al., 2012). Encontrou-se aumentada em pessoas com transtorno depressivo no soro e no tecido nervoso, podendo correlacionar-se a um transtorno depressivo refratário, o que corroboraria com a reduzida eficácia de fármacos antidepressivos e a casos refratários ao tratamento farmacológico (TALAROWSKA; SZEMRAJ; GAŁECKI, 2015).

Em nosso trabalho, verificou-se que o aumento do MPO no soro do animal que passou por privação maternal e apresenta comportamento do tipo depressivo em relação ao controle ($p < 0,05$) encontra-se em consonância com outros trabalhos (GAŁECKI et al., 2012; TALAROWSKA; SZEMRAJ; GAŁECKI, 2015; SOMANI et al., 2022). No trabalho de Talarowska; Szemraj; Gałeckı (2015), percebeu-se um aumento da expressão gênica do gene da MPO, justificando assim quadros tipo depressivos refratários. Isso corrobora com a relação entre o estresse oxidativo e o TDM, tendo em vista que o desbalanço do estresse oxidativo leva a um ambiente inflamatório e de alteração da fisiologia celular.

Além disso, a redução dos seus parâmetros com o uso tanto do escitalopram (10mg/kg) ($p < 0,01$) e do EHA da *A. citriodora* (30mg/kg) ($p < 0,05$) demonstraram que houve uma redução significativa no estresse oxidativo devido ao tratamento empregado. Esses dados são corroborados a partir de outros trabalhos em que intervenções levam a suas reduções a partir do tratamento empregado (IGNÁCIO et al., 2017; GOMES et al., 2022; GROLLI et al., 2023). No trabalho de GOMES et al. (2022), um ensaio com o uso da *A. citriodora* em ratos com comportamento tipo depressivo mostrou que houve uma redução nos níveis corticais de MPO. Apesar das amostras de hipocampo que avaliaram a MPO não apresentarem valores com relevância estatística, a literatura demonstra que há um aumento de MPO encefálico (IGNÁCIO et al., 2017; ORTMANN et al., 2017; GOMES et al., 2022; TUON et al., 2021; GROLLI et al., 2023). Dessa forma, apesar de apresentar um desempenho inferior ao do escitalopram, mas significativo, a *A. citriodora* pode vir a ser um adjuvante ao tratamento com os psicofármacos no transtorno depressivo.

Com relação ao TBARS, ele é um método laboratorial utilizado para medir a quantidade de malonaldeído e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, sendo estes, subprodutos da degradação de lipídios oxidados (NOBIS; ZALEWSKI; WASZKIEWICZ, 2020). Portanto, ele surge como um marcador indireto do estresse oxidativo. Apesar de não

ser um marcador específico, o TBARS apresenta-se elevado em transtornos depressivos (NOBIS; ZALEWSKI; WASZKIEWICZ, 2020).

Destaca-se que em nosso estudo, o TBARS apresentou elevação tanto no soro ($p < 0,05$) quanto no hipocampo ($p < 0,05$), se comparado com o grupo controle sem estresse, o que mais uma vez corrobora o papel do estresse oxidativo junto ao TDM. Da mesma forma, em outros trabalhos observou-se o mesmo achado (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2022; MOHAMMED et al., 2021; SOWA-KUĆMA et al., 2017; TUON et al., 2021). Na metanálise feita por Jiménez-Fernández et al. (2022), foi verificado em 40 estudos os níveis de TBARS elevados no TDM.

Neste estudo observou-se redução dos parâmetros da medição por meio do TBARS em hipocampo ($p < 0,05$) e soro ($p > 0,05$) tanto no tratamento com o escitalopram quanto com a *A. citriodora*. Essa redução demonstra que os tratamentos surtiram efeito terapêutico, tanto na redução dos comportamentos tipo depressivos, quanto com a melhora do balanço oxidativo. A literatura demonstra padrões semelhantes de melhora, tendo em vista o marcador TBARS e sua redução a partir do tratamento (IGNÁCIO et al., 2017). Destaca-se novamente o ensaio de IGNÁCIO et al. (2017), em que se observou uma redução dos níveis de TBARS na amígdala de ratos com transtorno tipo depressivo decorrente do uso crônico de quetiapina (20mg/kg). A não significância dos dados com relação ao TBARS no soro pode estar associado a outros fatores, tendo em vista ser um marcador não específico do estresse oxidativo, já que houve melhora do padrão de MPO no soro. Entretanto, também é importante a realização de mais estudos, tendo em vista que houve uma tendência de os tratamentos reduzirem os níveis de TBARS no soro. Da mesma forma, a melhora dos níveis de TBARS no hipocampo sugere que os tratamentos com *A. citriodora* e escitalopram promoveram uma redução do estresse oxidativo hipocampal em ratos submetidos ao estresse.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, utilizando o EHA de *A. citriodora*, demonstraram que tanto os aspectos comportamentais dos grupos experimentais quanto os marcadores de estresse oxidativo são consistentes com as evidências encontradas na literatura. Além de apresentar efeitos semelhantes ao escitalopram na reversão dos comportamentos depressivos, o extrato mostrou respostas satisfatórias na redução da atividade oxidante periférica e cerebral. No entanto, é necessário realizar novas pesquisas com os compostos ativos da planta, a fim de compreender melhor os mecanismos biológicos envolvidos e como ocorre essa atividade antioxidante nos casos de depressão, fazendo uso de outros marcadores de estresse, por exemplo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A PM em roedores foi responsável por desencadear comportamentos tipo depressivos em ratos adultos, além do desbalanço oxidativo por meio de alteração de marcadores como a MPO e TBARS. O tratamento realizado com o EHA de *A. citriodora* reverteu os comportamentos depressivos de forma similar ao grupo tratado com escitalopram. Com relação ao estresse oxidativo, a *A. citriodora* induziu um efeito antioxidante com desempenho semelhante ao antidepressivo escitalopram, comparado ao grupo de PM sem tratamento.

O estudo mostrou que a *A. citriodora* possui potencial antidepressivo e antioxidante, podendo vir a ser uma potencial estratégia de tratamento para o TDM no futuro. No entanto, há a necessidade de mais estudos mostrando os mecanismos e as substâncias pelas quais desempenha essa função.

O TDM é uma doença multifatorial que pode levar a incapacitação e ao suicídio, necessitando assim tratamentos eficientes para que as falhas terapêuticas sejam minimizadas. Para tanto, a *A. citriodora* surge como uma alternativa terapêutica para o tratamento desses quadros.

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**, 2006.
- ARAUCHI, R. et al. Gunn rats with glial activation in the hippocampus show prolonged immobility time in the forced swimming test and tail suspension test. **Brain and Behavior**, 2018.
- AZWANIDA N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, 2015.
- BHARAMSOLTANI, R. et al. *Aloysia citrodora* Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.
- BHATT, S.; NAGAPPA, A. N.; PATIL, C. R. Role of oxidative stress in depression. **Drug Discovery Today**, 2020.
- CANNIZZO, E. S. et al. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. **Journal of Proteomics**, 2011.
- DINIZ, B. S. et al. Oxidative stress markers imbalance in late-life depression. **Journal of Psychiatric Research**, 2018.
- ELECHEOSA, M. A. Essential oil chemotypes of *Aloysia citrodora* (Verbenaceae) in Northwestern Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, 2017.
- FREDDO, A. R. et al. Redução no tombamento *Fusarium* sp. em plântulas de beterraba, pelo tratamento das sementes com óleo essencial de *Aloysia citrodora* Palau. **Scientia Agraria Paranaensis**, 2016.
- GAŁECKI, P. et al. The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-IIA in patients with recurrent depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, 2012.
- 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**, 1987.
- GOMES, D. et al. Involvement of Anti-Inflammatory and Stress Oxidative Markers in the Antidepressant-like Activity of *Aloysia citrodora* and Verbascoside on Mice with Bacterial Lipopolysaccharide- (LPS-) Induced Depression. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2022.
- 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**, 2009.

GROLLI, R. E. et al. Quetiapine effect on depressive-like behaviors, oxidative balance, and inflammation in serum of rats submitted to chronic stress. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 2023.

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

HARAGUCHI, A. et al. Night eating model shows time-specific depression-like behavior in the forced swimming test. **Scientific Reports**, 2018.

HERSEY, M. et al. Inflammation-induced histamine impairs the capacity of escitalopram to increase hippocampal extracellular serotonin. **Journal of Neuroscience**, 2021.

MUNZER, A. et al. Impact of antidepressants on cytokine production of depressed patients in vitro. **Toxins (Basel)**, 2013.

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**, 2014.

IGNÁCIO, Z. M. et al. Acute and chronic treatment with quetiapine induces antidepressant-like behavior and exerts antioxidant effects in the rat brain. **Metabolic Brain Disease**, 2017.

IGNÁCIO, Z. M. et al. Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: Insights in depression. **Neuroscience**, 2014.

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

IGNACIO, Z. M. et al. The use of quetiapine in the treatment of major depressive disorder: Evidence from clinical and experimental studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2018

JENTZSCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Bio Med.**, 1996.

JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, S. et al. Oxidative stress parameters and antioxidants in adults with unipolar or bipolar depression versus healthy controls: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, 2022.

KOROVESIS, D.; RUBIO-TOMÁS, T.; TAVERNARAKIS, N. Oxidative Stress in Age-Related Neurodegenerative Diseases: An Overview of Recent Tools and Findings. **Antioxidants**, 2023.

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

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

LUCCA, G. et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochemistry International**, 2009.

Lúcia-lima. **Wikipedia**, 2010. Disponível em: < <https://pt.wikipedia.org/wiki/Lúcia-lima#>>. Acesso em: 12 de jul. de 2023.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2011.

MAES, M. et al. Increased autoimmune responses against auto-epitopes modified by oxidative and nitrosative damage in depression: Implications for the pathways to chronic depression and neuroprogression. **Journal of Affective Disorders**, 2013.

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**, 2001.

MALHI, Ginos; MANN, John. Depression. **The Lancet**, 2018.

MELLO, B. S. F. et al. Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. **Journal of Neuroimmunology**, 2018.

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**, 2010.

MONDAL, A. C.; FATIMA, M. Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: role of antidepressants treatment. **International Journal of Neuroscience**, 2018.

MOHAMMED, A. M. et al. Anxiety, depression-like behaviors and biochemistry disorders induced by cannabis extract in female mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2021.

NEGRELLE, R. R. B. et al. 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**, 2007.

NOBIS, A.; ZALEWSKI, D.; WASZKIEWICZ, N. Peripheral Markers of Depression. **Journal of Clinical Medicine**, 2020.

ORTMANN, C. F. et al. LC/QTOF profile and preliminary stability studies of an enriched flavonoid fraction of *Cecropia pachystachya* Trécul leaves with potential antidepressant-like activity. **Biomedical Chromatography**, 2017.

PAN, Z. et al. Cognitive impairment in major depressive disorder. **CNS Spectrums**, 2019.

- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain: stereotaxic coordinates. **Academic**, San Diego. 1986.
- PITSILLOU, E. et al. The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. **Molecular Biology Reports**, 2019.
- PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature.**, 1977.
- PRICE, R. B.; DUMAN, R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model. **Molecular Psychiatry**, 2019.
- RAGONE, M. I. Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora*, Palau on mice and rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2010.
- REUS, G. Z. et al. Ketamine and imipramine in the 48 nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. **Behav Brain Res.**, 2013.
- SEO, M. K. et al. Effects of escitalopram and paroxetine on mTORC1 signaling in the rat hippocampus under chronic restraint stress. **BMC Neurosci**, 2017.
- SHAHZAD, N. et al. Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2014.
- 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**, 2014.
- SHIMADA, H. et al. Depressive symptoms and cognitive performance in older adults. **Journal of Psychiatric Research**, 2014.
- Siqueira, J. E. "Bioética na Terminalidade da Vida". **Boletim da Sociedade Brasileira de Bioética**, 2000
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 1965.
- SOMANI, A. et al. Oxidative and Nitrosative Stress in Major Depressive Disorder: A Case Control Study. **Brain Sciences**, 2022.
- SOWA-KUĆMA, M. et al. Lipid Peroxidation and Immune Biomarkers Are Associated with Major Depression and Its Phenotypes, Including Treatment-Resistant Depression and Melancholia. **Neurotoxicity Research**, 2017.
- SUZUKI, K. et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**, 1983.
- TALAROWSKA, M.; SZEMRAJ, J.; GAŁECKI, P. Myeloperoxidase gene expression and cognitive functions in depression. **Advances in Medical Sciences**, 2015.

TUON, T. et al. Behavior and oxidative stress parameters in rats subjected to the animal's models induced by chronic mild stress and 6-hydroxydopamine. **Behavioural Brain Research**, 2021.

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

WIGNER, P. et al. Variation of genes involved in oxidative and nitrosative stresses in depression. **European Psychiatry**, 2018.

WOISKY, Ricardo; SALATINO, Antonio. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, 1998.

WOLKOWITZ, O. M. et al. Serum BDNF levels before treatment predict SSRI response in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental health of older adults**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Acesso em: 22 ago. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254610>. Acesso em: 12 jul. 2023.

YU, H.; CHEN, Z. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2010.

ZENI, A. L. B. et al. Evidence of the involvement of the monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Aloysia gratissima*. **Journal of Ethno-Farmacology**, 2013.

ANEXO A – Carta de aprovação da pesquisa pela CEUA da UNOCHAPECÓ



**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Função da Epigenética Intergeracional, Envelhecimento Celular e Comportamentos Tipo Depressivos a Partir do Estresse na Infância [] Potencial Terapêutico de Compostos da Centella asiatica", protocolada sob o CEUA nº 9251091121 (925109121), sob a responsabilidade de **Zuleide Maria Ignácio** e equipe; Amanda Gollo Bertollo; Tácio de Oliveira; Walter Antônio Roman Junior; Lillian Caroline Bohnen; Maíquel Eduarda Dama Mingoti; Agatha Carina Leite Galvan; Jesiel de Medeiros - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEUA/UFFS) na reunião de 25/03/2022.

We certify that the proposal "Role of Intergenerational Epigenetics, Cell Aging and Depressive-Type Behaviors from Childhood Stress - Therapeutic Potential of Centella asiatica Compounds", utilizing 173 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 9251091121 (925109121), under the responsibility of **Zuleide Maria Ignácio** and team; Amanda Gollo Bertollo; Tácio de Oliveira; Walter Antônio Roman Junior; Lillian Caroline Bohnen; Maíquel Eduarda Dama Mingoti; Agatha Carina Leite Galvan; Jesiel de Medeiros - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of South Border (CEUA/UFFS) in the meeting of 03/25/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2022 a 03/2024** Área: **Ciências da Saúde**

Origem:	Aplicável ao Biotério		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas
Linhagem:	Wistar	Idade:	0 a 80 dias
		Peso:	6 a 400 g
		N:	173

Local do experimento: Laboratório de fisiologia, farmacologia e psicopatologia do bloco 1 de laboratórios da UFFS do Campus Chapecó. Ao lado do laboratório fica a sala de criação e manutenção dos animais experimentais, a qual está cadastrada no CIUCA, como Biotério Setorial da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó, SC.

Realiza, 25 de março de 2022

Prof. Dr. Valfredo Schiemper
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Fronteira Sul

Profa. Dra. Gabrielle Coelho Freitas
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Fronteira Sul