



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS CHAPECÓ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**AMANDA GOLLO BERTOLLO**

**EFEITO INTERGERACIONAL DO ESTRESSE NA INFÂNCIA SOBRE  
COMPORTAMENTOS TIPO DEPRESSIVOS E FUNÇÃO DOS  
GLICOCORTICÓIDES NO NÚCLEO ACCUMBENS: POTENCIAL TERAPÊUTICO  
DA *Centella asiatica***

**CHAPECÓ**

**2024**



**AMANDA GOLLO BERTOLLO**

**EFEITO INTERGERACIONAL DO ESTRESSE NA INFÂNCIA SOBRE  
COMPORTAMENTOS TIPO DEPRESSIVOS E FUNÇÃO DOS  
GLICOCORTICÓIDES NO NÚCLEO ACCUMBENS: POTENCIAL TERAPÊUTICO  
DA *Centella asiatica***

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Zuleide Maria Ignácio

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Margarete Dulce Bagatini

**CHAPECÓ**

**2024**

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFES**

Bertollo, Amanda Gollo  
EFEITO INTERGERACIONAL DO ESTRESSE NA INFÂNCIA SOBRE  
COMPORTAMENTOS TIPO DEPRESSIVOS E FUNÇÃO DOS  
GLICOCORTICÓIDES NO NÚCLEO ACCUMBENS: POTENCIAL  
TERAPÊUTICO DA Centella asiatica / Amanda Gollo  
Bertollo. -- 2024.  
74 f.

Orientadora: Dr Zuleide Maria Ignácio  
Co-orientadora: Dr Margarete Dulce Bagatini  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biomédicas, Chapecó, SC, 2024.

1. Privação maternal. 2. Isolamento social. 3.  
Depressão. 4. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. 5.  
Centella asiatica. I. Ignácio, Zuleide Maria, orient.  
II. Bagatini, Margarete Dulce, co-orient. III.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.



AMANDA GOLLO BERTOLLO

**EFEITO INTERGERACIONAL DO ESTRESSE NA INFÂNCIA SOBRE  
COMPORTAMENTOS TIPO DEPRESSIVOS E FUNÇÃO DOS  
GLICOCORTICÓIDES NO NÚCLEO ACCUMBENS: POTENCIAL TERAPÊUTICO  
DA *Centella asiatica***

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 13/12/2024

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Zuleide Maria Ignácio – UFFS  
Orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Margarete Dulce Bagatini – UFFS  
Coorientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Daniela Zanini – UFFS  
Avaliadora interna

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lilian Caroline Bohnen - UNOCHAPECÓ  
Avaliadora externa

## **Resumo**

O transtorno depressivo maior (TDM) é um transtorno grave e que causa enorme perda da qualidade de vida das pessoas, sendo uma das formas mais prevalentes de doença mental. Entre os fatores mais relevantes subjacentes ao TDM está o estresse na infância. Além disso, a falta de suporte social nos períodos da adolescência e de adultos jovens pode potencializar os efeitos dos traumas na infância, contribuindo de forma relevante, tanto para desencadear, quanto para aumentar a gravidade do TDM. A privação maternal (PM) e isolamento social (IS) em roedores são modelos comportamentais que mimetizam de forma mais natural os traumas no início da vida e na vida adulta das pessoas. O estresse no início da vida também é um grande vilão nas alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), podendo levar a uma condição de resistência aos glicocorticóides. Importante destacar que as alterações a partir do estresse no início e ao longo da vida podem ser transmitidas e desencadear prejuízos comportamentais e biológicos na geração descendente dessas mães. Portanto, este estudo avaliou em ratos machos e fêmeas, o efeito do estresse de PM nos primeiros dias de vida, associado ao IS em adultos jovens, tanto na primeira geração, quanto em adultos jovens não estressados, descendentes de mães que passaram pelos protocolos de estresse antes do período de prenhez. Foram avaliados comportamentos tipo depressivos e expressão gênica de proteínas envolvidas com a função do eixo HHA no núcleo accumbens (NAc). O estudo também investigou o possível efeito terapêutico de extrato e composto ativo ácido madecássico da espécie medicinal *Centella asiatica* (*C. asiatica*), tanto no TDM, quanto na expressão gênica. Os protocolos de estresse por PM e IS induziram comportamentos tipo depressivos em machos e fêmeas na fase I. Esses animais apresentaram redução na expressão de NR3C1 e FKBP5 no NAc, sugerindo que o estresse na infância e a falta de suporte social na vida adulta culminam em alterações na função do eixo HHA. Tratamentos com *C. asiatica*, ácido madecássico e escitalopram reduziram significativamente os comportamentos tipo depressivos e aumentaram a expressão desses genes nos animais da fase I. Esses achados sugerem uma potencial ação antidepressiva da *C. asiatica* e seu composto ativo, o ácido madecássico. Paralelamente, o extrato e o composto ativo reverteram a redução da expressão gênica de NR3C1 e FKBP5 no NAc em animais da primeira geração expostos ao estresse. Nos animais da fase II, o estresse pré-gestação nas fêmeas induziu comportamentos tipo depressivos nos descendentes, sendo revertidos por tratamentos com *C. asiatica* (machos) e *C. asiatica* e ácido madecássico (fêmeas), reforçando o impacto intergeracional do estresse. No entanto, as alterações identificadas no comportamento dos animais da fase II não foram acompanhadas de alteração da expressão gênica de NR3C1 e FKBP5 no NAc. Os resultados sugerem que o extrato de *C. asiatica* e o composto ativo ácido madecássico possuem potencial antidepressivo, modulando os efeitos do estresse crônico na infância, tanto nos animais que sofreram o estresse, quanto em seus descendentes que não foram submetidos aos protocolos de estresse.

**Palavras-chave:** Privação maternal; Isolamento social; Depressão; Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; *Centella asiatica*.

## Abstract

Major depressive disorder (MDD) is a severe condition that causes a significant loss in people's quality of life, being one of the most prevalent forms of mental illness. Among the most relevant factors underlying MDD is childhood stress. Additionally, the lack of social support during adolescence and early adulthood can amplify the effects of childhood trauma, contributing both to triggering and increasing the severity of MDD. Maternal deprivation (MD) and social isolation (SI) in rodents are behavioral models that more naturally mimic early-life and adult-life traumas in humans. Early-life stress is also a major culprit in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis alterations, potentially leading to glucocorticoid resistance. It is essential to highlight that changes resulting from early-life and lifelong stress can be transmitted and cause behavioral and biological impairments in the offspring of these mothers. Therefore, this study evaluated the effect of early-life MD stress combined with SI in young adulthood on both male and female rats, focusing on the first-generation and non-stressed young adults, offspring of mothers who underwent stress protocols before the gestation period. Depressive-like behaviors and gene expression of proteins involved in HPA axis function in the nucleus accumbens (NAc) were evaluated. The study also investigated the possible therapeutic effect of extract and active compound madecassic acid from the medicinal species *Centella asiatica* (*C. asiatica*) in MDD and gene expression. MD and SI stress protocols induced depressive-like behaviors in males and females in phase I. These animals showed reduced expression of NR3C1 and FKBP5 in the NAc, suggesting that childhood stress and the lack of social support in adulthood culminate in alterations in HPA axis function. Treatments with *C. asiatica*, madecassic acid, and escitalopram significantly reduced depressive-like behaviors and increased the expression of these genes in phase I animals. These findings suggest a potential antidepressant action of *C. asiatica* and its active compound, madecassic acid. Additionally, the extract and the active compound reversed the reduction in NR3C1 and FKBP5 gene expression in the NAc of first-generation animals exposed to stress. In phase II animals, pre-gestational stress in females induced depressive-like behaviors in their offspring, which were reversed by treatments with *C. asiatica* (males) and *C. asiatica* and madecassic acid (females), reinforcing the intergenerational impact of stress. However, the changes identified in phase II animal behavior were not accompanied by NR3C1 and FKBP5 gene expression alterations in the NAc. The results suggest that *C. asiatica* extract and the active compound madecassic acid have antidepressant potential, modulating the effects of chronic childhood stress in animals that experienced stress and in their offspring who were not subjected to stress protocols.

**Keywords:** Maternal deprivation; Social isolation; Depression; Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; *Centella asiatica*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação do GR no citoplasma de indivíduos com e sem TDM	25
Figura 2 - Estrutura física do ácido madecássico	28
Figura 3 - Desenho experimental da primeira fase	31
Figura 4 - Desenho experimental da segunda fase	31
Figura 5 - Estruturas químicas no extrato de <i>C. asiatica</i>	35
Figura 6 - Teste de natação forçada em machos fase I	36
Figura 7 - Teste de natação forçada em fêmeas fase I	37
Figura 8 - Teste de natação forçada em machos fase II	38
Figura 9 - Teste de natação forçada em fêmeas fase II	39
Figura 10 - Atividade locomotora no campo aberto em machos fase I	40
Figura 11 - Atividade locomotora no campo aberto em fêmeas fase I	41
Figura 12 - Atividade locomotora no campo aberto em machos fase II	42
Figura 13 - Atividade locomotora no campo aberto em fêmeas fase II	43
Figura 14 - Expressão gênica de NR3C1 no NAc de machos fase I	44
Figura 15 - Expressão gênica de NR3C1 no NAc de fêmeas fase I	45
Figura 16 - Expressão gênica de NR3C1 no NAc de machos fase II	46
Figura 17 - Expressão gênica de NR3C1 no NAc de fêmeas fase II	47
Figura 18 - Expressão gênica de FKBP5 no NAc de machos fase I	48
Figura 19 - Expressão gênica de FKBP5 no NAc de fêmeas fase I	49
Figura 20 - Expressão gênica de FKBP5 no NAc de machos fase II	50
Figura 21 - Expressão gênica de FKBP5 no NAc de fêmeas fase II	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BIOCHUFFS	Biotério Setorial da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)
<i>C. asiatica</i>	<i>Centella asiatica</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIUCA	Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COVID-19	Doença por coronavírus 2019
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DRT	Depressão resistente a tratamento
FKBP51	Proteína de Ligação à FK506 de 51 kDa
FKBP52	Proteína de Ligação à FK506 de 52 kDa
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GR	Receptor de glicocorticoide
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
HHA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IL	Interleucina
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
IS	Isolamento social
LPS	Lipopolissacarídeos
miRNA	microRNA



mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
NAC	Núcleo accumbens
OMS	Organização Mundial da Saúde
PM	Privação maternal
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UNOCHAPECÓ	Universidade Comunitária da Região de Chapecó

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 GERAIS.....	14
2.2 ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
3.1 DEFINIÇÃO, FISIOPATOLOGIA E MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	15
3.2 GENÉTICA, EPIGENÉTICA E O TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	18
3.3 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL E TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	21
3.4 A C. asiatica E O TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	26
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1 PREPARAÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO DE C. asiática.....	28
4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	29
4.3 PRIVAÇÃO MATERNAL E ISOLAMENTO SOCIAL.....	29
4.4 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS.....	30
4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	30
4.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	32
4.7 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	32
4.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	33
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
5.1 ANÁLISE DOS COMPONENTES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE C. asiatica.....	34
5.2 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO EM MACHOS DA FASE I.....	35
5.3 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO EM FÊMEAS DA FASE I.....	36
5.4 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO EM MACHOS DA FASE II.....	37
5.5 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO EM FÊMEAS DA FASE II.....	38
5.6 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM MACHOS DA FASE I.....	39
5.7 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM FÊMEAS DA FASE I.....	40

5.8 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM MACHOS DA FASE II.....	41
5.9 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM FÊMEAS DA FASE II.....	42
5.10 EFEITOS DA PM + IS, E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE NR3C1 NO NAc DE MACHOS DA FASE I.....	43
5.11 EFEITOS DA PM + IS, E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE NR3C1 NO NAc DE FÊMEAS.....	44
5.12 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE NR3C1 EM MACHOS DA FASE II.....	45
5.13 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE NR3C1 EM FÊMEAS DA FASE II.....	46
5.14 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FKBP5 NO NAc DE MACHOS FASE I.....	47
5.15 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FKBP5 NO NAc DE FÊMEAS FASE I.....	48
5.16 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FKBP5 NO NAc DE MACHOS DA FASE II.....	49
5.17 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FKBP5 NO NAc DE FÊMEAS DA FASE II.....	50
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO A - Certificado de aprovação da pesquisa pelo CEUA da UFES.....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que o transtorno depressivo maior (TDM) afetava mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo e foi a maior causa de incapacidades em 2017. O TDM é a principal causa de mortes por suicídio, contribuindo para 800.000 suicídios por ano (WHO, 2017). Além disso, apenas no primeiro ano de pandemia de COVID-19, os casos subiram cerca de 30% (WHO, 2022a), destacando a relevância do estudo deste transtorno.

A adversidade na infância parece ser um relevante fator predisponente à severidade e à refratariedade aos tratamentos. Foi identificado em um estudo de coorte que 62% dos indivíduos avaliados com diagnóstico de depressão resistente a tratamento (DRT) apresentaram pelo menos um tipo de adversidade na infância (Tunnard *et al.*, 2014). Além disso, os eventos mais traumáticos mostraram maior associação com a predisposição ao suicídio (Sabawoon *et al.*, 2022).

O estresse no início da vida está relacionado com modulação de mecanismos biológicos ao longo do desenvolvimento e é potencializado por estímulos estressantes na vida adulta. A privação materna (PM) de roedores no início da vida, combinada com isolamento social (IS) na idade jovem, pode aumentar os riscos de comprometimento metabólico, comportamentos tipo depressivos e reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Trujillo, Durando e Suárez, 2016; Vargas *et al.*, 2016).

Evidências sugerem que o TDM originado de eventos traumáticos na infância pode estar associado a alterações epigenéticas, afetando a expressão gênica e resultando em mudanças fenotípicas, inclusive relacionadas à saúde mental. Ainda, estudos apontam que essas alterações epigenéticas podem ser transmitidas para as gerações futuras a partir da epigenética intergeracional (Chan *et al.*, 2020; Heard e Martienssen, 2014; Ignácio *et al.*, 2014; Koenig *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2019b; Weinhold, 2006).

A resistência aos glicocorticóides é considerada a característica fisiológica mais significativa no TDM. É observada em 80% dos pacientes com humor deprimido de longa duração e alterações substanciais nas funções neurovegetativas e cognitivas (Green *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2020). A imunofilina FKBP51, componente de um complexo multiproteico citoplasmático, desempenha um papel crucial na resistência aos glicocorticóides, competindo com a imunofilina FKBP52 pelo sítio de ligação do receptor de glicocorticoide (GR), sendo substituída durante a ligação do hormônio e influenciando a

translocação do receptor para o núcleo, o que pode impactar a ação dos glicocorticóides durante períodos estressantes (Echeverria e Picard, 2010; Jiang *et al.*, 2019; Merkulov, Merkulova e Bondar, 2017; Zgajnar *et al.*, 2019). Mudanças no eixo HHA podem ser decorrentes de modulação epigenética (Palma-Gudiel *et al.*, 2021).

O núcleo accumbens (NAc) é uma região chave na regulação do prazer e da motivação. No TDM, disfunções no NAc são associadas à anedonia e à resistência aos glicocorticóides, contribuindo para a incapacidade de experimentar prazer e para déficits emocionais significativos no transtorno (Li *et al.*, 2022). Essas alterações reforçam a compreensão do TDM como um transtorno que vai além do humor, impactando o sistema de recompensa e motivação do indivíduo (Mavridis, 2015).

As estratégias terapêuticas disponíveis para o TDM, além de não induzirem uma resposta efetiva na maior parte dos indivíduos, um grande percentual é totalmente refratário aos tratamentos e corre sérios riscos de suicídio (Cui *et al.*, 2024; Voineskos, Daskalakis e Blumberger, 2020). Apenas 30,6% dos indivíduos respondem adequadamente ao primeiro antidepressivo ofertado, e, conforme as tentativas se seguem, a taxa reduz ainda mais, chegando a apenas 13% de resposta na quarta tentativa (Goodwin *et al.*, 2022).

Neste cenário, os estudos preliminares acerca da *Centella asiatica* (*C. asiatica*) sugerem que a espécie e alguns compostos ativos podem apresentar resultados importantes em alguns mecanismos biológicos ainda pouco explorados e, portanto, apontam para uma perspectiva de uma potencial estratégia terapêutica para o TDM. A administração oral em camundongos de ácido madecássico, um composto ativo da espécie, induziu efeito antioxidante no tecido renal. Além disso, após administração oral crônica foi verificada a biodisponibilidade do ácido madecássico em vários tecidos, incluindo o tecido cerebral (Yin *et al.*, 2012).

Os estudos sobre efeito antidepressivo ainda são escassos. Dois estudos observaram efeito tipo antidepressivo a partir de triterpenos da *C. asiatica* em camundongos (Chen *et al.*, 2003, 2005). Um estudo recente traz evidências de que uma gama de efeitos medicinais benéficos da *C. asiatica* e seus compostos ativos estão amplamente relacionados a efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Sun *et al.*, 2020).

Apesar de os estudos sobre *C. asiatica* ainda serem limitados, as evidências iniciais indicam que a planta e seus compostos ativos têm potencial terapêutico, especialmente devido aos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antidepressivos. Esses resultados destacam a importância de novos protocolos de estudos que objetivem explorar o potencial terapêutico

dessa espécie medicinal.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 GERAIS**

- Avaliar comportamentos tipo depressivos e expressão gênica relacionada ao eixo HHA no núcleo accumbens (NAc) de ratos machos e fêmeas, submetidos a estresse no início da vida e na fase jovem da vida adulta, bem como em descendentes de ratas mães que sofreram o acúmulo de estresse antes da prenhez.
- Avaliar o efeito do tratamento com extratos de *C. asiática* e do composto ativo ácido madecássico nos comportamentos tipo depressivos e expressão gênica no NAc de ratos machos e fêmeas que sofreram estresse no início e fase jovem da vida e em descendentes de mães que sofreram o acúmulo de estresse antes da prenhez.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Avaliar comportamentos tipo depressivos em ratos machos e fêmeas submetidos a estresse de privação maternal (PM) nos primeiros dias de vida e isolamento social (IS) na fase jovem da vida adulta, e em descendentes adultos de fêmeas que sofreram o estresse antes da prenhez;
- Investigar o efeito do estresse de PM e IS na expressão gênica dos genes FKBP5 e NR3C1 no NAc de ratos machos e fêmeas adultos que sofreram estresse de PM e IS e em descendentes adultos de fêmeas que sofreram o estresse antes da período de prenhez;
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com extratos de *C. asiatica* e o composto ativo ácido madecássico nos possíveis comportamentos tipo depressivos e expressão gênica de FKBP5 e NR3C1 no NAc de ratos que sofreram estresse no início e na fase jovem da vida e em filhotes adultos jovens de ratas que sofreram estresse antes da gestação.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 DEFINIÇÃO, FISIOPATOLOGIA E MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR**

O TDM é um transtorno grave e que causa enorme perda da qualidade de vida das pessoas (Solek *et al.*, 2019), sendo uma das formas mais prevalentes de doença mental (Larsen *et al.*, 2010). A prevalência varia de acordo com o país e a região, mas é encontrada em todas as faixas etárias e afeta mais as mulheres do que os homens. O TDM também tem um impacto econômico significativo, pois a perda de produtividade relacionada a transtornos mentais custou à economia global mais de 1 trilhão de dólares apenas no ano de 2017 (WHO, 2017).

Nos últimos anos houve um aumento exorbitante dos casos de TDM ao redor do mundo. Vários fatores, como IS, incerteza, restrições e preocupações relacionadas à saúde, têm contribuído para agravar os sintomas do TDM em muitas pessoas. É importante ressaltar que diferentes grupos populacionais têm sido afetados de maneiras distintas, com algumas pessoas sendo mais suscetíveis aos efeitos negativos na saúde mental do que outras. Durante o início da pandemia de COVID-19, aqueles que já sofriam de TDM podem ter experimentado uma intensificação de seus sintomas, enquanto outras pessoas podem ter enfrentado o transtorno pela primeira vez (Bertollo *et al.*, 2023; WHO, 2022a).

Os sintomas do TDM podem variar de pessoa para pessoa, mas normalmente incluem humor deprimido, anedonia, alterações no apetite, distúrbios do sono, fadiga, falta de concentração e sentimentos de culpa ou baixa autoestima, que podem ter um impacto significativo na qualidade de vida, nas relações interpessoais, no desempenho acadêmico e profissional e até mesmo aumentar o risco de suicídio (WHO, 2022b). O diagnóstico é feito pela sintomatologia clínica, presente por pelo menos duas semanas, e de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5) (American Psychiatric Association, 2022).

O TDM é uma condição complexa e cada indivíduo pode ter uma combinação única de fatores de risco e desencadeantes. A interação entre esses diferentes elementos é o que contribui com a etiologia do transtorno, que envolve fatores biológicos, sociais, psicológicos e genéticos. A fisiopatologia do TDM também é complexa e multifatorial, envolvendo uma

interação entre fatores genéticos, neuroquímicos, hormonais e ambientais. Embora a compreensão exata dos mecanismos subjacentes ao TDM ainda seja limitada, diversos estudos sugerem que alterações biológicas e neuroquímicas desempenham um papel importante. Alterações em neurotransmissores, aumento de marcadores inflamatórios, e fatores genéticos são os principais fatores que contribuem com a fisiopatologia do TDM. Além disso, o estresse oxidativo e alterações na via da quinurenina, na via do alvo mamífero da rapamicina (mTOR → da expressão em inglês), no eixo HHA, e no sistema purinérgico também influenciam o quadro (Bertollo *et al.*, 2023; Mingoti *et al.*, 2023).

Uma das hipóteses mais estudada para o TDM é a monoaminérgica. De acordo com essa hipótese, ocorre um desequilíbrio na neurotransmissão das monoaminas, como a serotonina, noradrenalina e dopamina, reduzindo a função destes neurotransmissores. Estes neurotransmissores têm um papel fundamental na regulação do humor e do comportamento e, no TDM, sua disfunção resulta em um desequilíbrio neuroquímico associado aos sintomas depressivos (Blier e El Mansari, 2013). Diversas regiões cerebrais são afetadas pelo transtorno, como o NAc, que apresenta desregulação de neurotransmissores, como serotonina, dopamina, glutamato e sinalização GABA (Li *et al.*, 2022), e mudanças funcionais e morfológicas, como hipoativação e volume diminuído (Mavridis, 2015). Essas alterações neuroquímicas podem levar a um prejuízo no processamento de recompensa, culminando em anedonia, um dos sintomas centrais do TDM (Li *et al.*, 2022).

A presença de inflamação crônica identificada por alteração nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1, IL-6, e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), também tem sido associada ao TDM (Felger e Lotrich, 2013). A ativação do sistema imunológico e a liberação de citocinas pró-inflamatórias podem afetar negativamente o funcionamento do cérebro, levando ao desenvolvimento e à manutenção dos sintomas depressivos (Miller e Raison, 2016).

Além disso, diversos genes estão implicados na suscetibilidade ao transtorno, incluindo aqueles envolvidos na regulação do sistema serotoninérgico, noradrenérgico e do eixo HHA. Um estudo com famílias e gêmeos mostrou uma maior concordância para o TDM em parentes de primeiro grau de indivíduos com TDM (Sullivan, Neale e Kendler, 2000).

Os antidepressivos clássicos disponíveis constituem uma classe de medicamentos amplamente utilizados no tratamento do TDM. Esses medicamentos incluem os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como o escitalopram, fluoxetina, e sertralina, os tricíclicos, como a amitriptilina e imipramina, e os inibidores da monoaminoxidase, como a

tranilcipromina e a fenelzina. Eles agem principalmente aumentando a disponibilidade de neurotransmissores, como serotonina, noradrenalina e dopamina no sistema nervoso central (SNC), ajudando a melhorar o humor e aliviar os sintomas depressivos (Cleare *et al.*, 2015; Fitzgerald e Bronstein, 2013).

O TDM vem muitas vezes acompanhado de outros transtornos psiquiátricos. A presença de comorbidades parece aumentar a gravidade e contribuir com a pobre resposta aos tratamentos com antidepressivos clássicos, uma condição conhecida como DRT (De Carlo, Calati e Serretti, 2016).

Entre os fatores psicossociais, um grande número de evidência destaca que o estresse na infância é um dos fenômenos mais potentes em precipitar a expressão de um genótipo predisponente ao TDM (Ignácio *et al.*, 2014). Vários mecanismos biológicos parecem surgir como consequência de estresse no início da vida, o que indica que eles estão relacionados ou interagem entre si. Esses processos se acumulam ao longo do tempo, resultando em uma carga de estresse constante e podendo levar ao desenvolvimento de TDM (Ignácio *et al.*, 2017; Scheuer *et al.*, 2018).

Um aspecto fundamental é o fato de que o estresse no início da vida parece estar envolvido na gravidade do transtorno e na pobre resposta aos tratamentos antidepressivos, tanto em humanos (Williams *et al.*, 2016) quanto em animais submetidos a protocolos de PM (Zhang *et al.*, 2015). Roedores submetidos a protocolos de PM nos primeiros dias de vida apresentaram níveis elevados de comportamentos tipo ansiosos no teste de labirinto em cruz elevado e comportamentos tipo anedônico e depressivo em testes de anedonia e natação forçada, respectivamente (Ignácio *et al.*, 2017; Réus *et al.*, 2015). Um aspecto relevante que emerge da utilização do modelo de PM é o fato de mimetizar uma situação grave de violência, abandono e falta de cuidado em crianças humanas, sendo considerado um dos mais poderosos estressores naturais durante o desenvolvimento (IGNÁCIO *et al.*, 2017).

A interação entre o estresse perinatal, como é o caso da PM, e o neurodesenvolvimento, envolve a possibilidade de alterações epigenéticas que, por sua vez, podem interferir na neurogênese, na diferenciação neuronal e nos padrões de conexão sináptica, potencialmente contribuindo para efeitos a longo prazo no funcionamento cerebral e na saúde mental (Stenz *et al.*, 2018).

Outro modelo de estressor que apresenta semelhanças com condições psicossociais na espécie humana é o estresse por IS em roedores (Djordjevic *et al.*, 2012). O estresse por IS, além de resultar em comportamentos tipo depressivos e ansiosos em animais, causa alterações

em diversas funções biológicas observadas no TDM e que estão envolvidas em mecanismos funcionais e estruturais relacionados a danos na plasticidade neuronal, principalmente em estruturas cerebrais límbicas (Djordjevic *et al.*, 2010).

Um fenômeno relevante que deve ser aprofundado é o fato de que o estresse no início da vida pode sofrer modulação ao longo do desenvolvimento (Van Zyl, Dimatelis e Russell, 2016; Vargas *et al.*, 2016) e também pode ser potencializado por estímulos estressantes na vida adulta (Trujillo, Durando e Suárez, 2016). O estresse a partir da PM, combinado com o IS na idade jovem, parece aumentar ainda mais o risco de comprometimento metabólico, comportamentos tipo depressivos e reatividade do eixo HHA quando comparado a apenas um dos estressores (Vargas *et al.*, 2016).

### 3.2 GENÉTICA, EPIGENÉTICA E O TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

A genética é o estudo dos genes e de como eles são transmitidos de geração em geração. Ela investiga a hereditariedade e como os genes influenciam as características físicas e traços comportamentais dos organismos. Os genes são sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) que carregam as informações necessárias para a produção de proteínas e desempenham um papel fundamental na determinação das características biológicas de um indivíduo (Collins, 2001).

O DNA é composto por uma dupla hélice formada por duas cadeias de nucleotídeos que se enrolam em torno de um eixo central. Cada cadeia é composta por unidades de nucleotídeos, que consistem em uma base nitrogenada (adenina, timina, citosina ou guanina), um grupo fosfato, e um açúcar (desoxirribose). A cromatina é a estrutura em que o DNA é organizado dentro do núcleo das células eucarióticas. Ela é composta por DNA, proteínas histonas e outras proteínas não histônicas. As histonas são proteínas básicas que se associam ao DNA formando octâmeros, conhecidos como nucleossomos. Cada nucleossomo é composto por um segmento de DNA que se enrola em torno de um núcleo de histonas. A estrutura da cromatina é altamente dinâmica e pode sofrer modificações para regular a expressão gênica (Watson e Crick, 1953).

Diversos sistemas contribuem com a transmissão de informações entre gerações, pois nem tudo que é herdado é genético. Existem formas de passar informações em um nível supra genético, como pelos sistemas epigenético, comportamental e simbólico. Assim, adaptações

que ocorrem durante a vida são acopladas muito mais diretamente às informações que o organismo transmite para a próxima geração (Jablonka e Lamb, 2005).

A epigenética é um termo que se refere a mudanças na expressão de genes que não envolvem alterações na ordem dos nucleotídeos da sequência do DNA. A metilação do DNA, e acetilação e desacetilação de histonas são algumas das principais formas de modulação epigenética. Essas modificações podem ser influenciadas por fatores ambientais, como a nutrição, o estresse e a exposição a toxinas, e podem afetar a atividade dos genes, tendo papel crucial no desenvolvimento e na diferenciação celular (Weaver *et al.*, 2004).

A metilação do DNA envolve a adição de grupos metil (-CH<sub>3</sub>) em locais específicos do DNA, geralmente nas bases citosina que estão adjuntas a guaninas (sítios CpG), o que pode resultar na inativação gênica. A metilação do DNA é uma modificação estável e hereditária que pode regular a expressão gênica ao influenciar a acessibilidade do DNA aos fatores de transcrição. As enzimas responsáveis pela adição de grupos -CH<sub>3</sub> às bases de citosina no DNA são as DNA metiltransferases (DNMTs). Existem várias isoformas de DNMT, sendo a DNMT1 a principal envolvida na manutenção da metilação durante a replicação do DNA. A metilação do DNA mediada pelas DNMTs está associada à regulação da expressão gênica, silenciamento de genes e estabilidade do genoma (Bakusic *et al.*, 2017; Weaver *et al.*, 2004). Um estudo identificou que certos genes que sofreram altos níveis de metilação apresentam expressão gênica reduzida nos indivíduos com TDM, alterações que podem estar associadas a vias biológicas envolvidas na regulação do humor, estresse e resposta imune (Wang *et al.*, 2021).

A acetilação e desacetilação das histonas, por sua vez, envolvem a adição ou remoção de grupos acetil (-COCH<sub>3</sub>) às histonas que compõem a estrutura da cromatina. A acetilação das histonas está associada à ativação gênica, relaxando a estrutura da cromatina e facilitando o acesso dos fatores de transcrição ao DNA. Por outro lado, a desacetilação das histonas geralmente está associada à inativação gênica, tornando a cromatina mais compacta e dificultando a transcrição do DNA (Chavez-Blanco *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 2004).

As histonas desacetilase (HDACs) são as enzimas responsáveis pela remoção de grupos acetil das histonas. Elas atuam revertendo a acetilação das histonas, levando a uma maior compactação da cromatina e consequente silenciamento da expressão gênica. A desacetilação das histonas pelas HDACs está relacionada à repressão da transcrição e à formação de uma estrutura de cromatina mais fechada. Por outro lado, as histonas acetiltransferase (HATs) são enzimas responsáveis pela adição de grupos acetil às histonas.

Elas atuam adicionando grupos acetil (-COCH<sub>3</sub>) às lisinas presentes nas caudas das histonas, relaxando a estrutura da cromatina e facilitando a transcrição gênica. A acetilação das histonas pelas HATs está associada à ativação da expressão gênica e à formação de uma estrutura de cromatina mais aberta (Chavez-Blanco *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 2004).

Há uma forte e complexa interação entre fatores ambientais e mecanismos epigenéticos no desenvolvimento de distúrbios relacionados ao estresse, como o TDM. Os fatores ambientais, como estresse crônico, trauma ou adversidades na infância, podem desencadear alterações nos padrões de metilação do DNA e modificações das histonas. Essas mudanças epigenéticas podem influenciar a expressão de genes relacionados a vias neurobiológicas envolvidas na regulação do humor, resposta ao estresse e plasticidade neuronal (Chmielewska *et al.*, 2019). Um estudo recente demonstrou que alterações epigenéticas foram mais significativas na depressão mais grave e em indivíduos com TDM que sofreram traumas na infância (Han *et al.*, 2019). As mudanças epigenéticas podem ser moduladas ou revertidas, o que sugere a possibilidade de intervenções terapêuticas farmacológicas para reverter essas alterações e melhorar os sintomas do TDM (Szyf, 2012).

Em suma, evidências crescentes sugerem que o TDM a partir de eventos traumáticos na infância pode estar associado com alterações epigenéticas (Park *et al.*, 2019a). Essas mudanças afetam os mecanismos e processos associados à função do DNA, resultando em um desvio no curso da expressão gênica, que se refere à ativação ou desativação dos genes para produzir proteínas específicas. As alterações epigenéticas podem fazer com que genes que normalmente seriam silenciados sejam ativados, ou vice-versa. Isso pode levar a alterações na produção de proteínas, que são fundamentais para o funcionamento normal das células e para a saúde mental. Como resultado, essas mudanças epigenéticas podem causar alterações fenotípicas, ou seja, mudanças observáveis no comportamento, nas características físicas ou na função biológica de um indivíduo (Weinhold, 2006). Embora as alterações epigenéticas sejam cruciais durante o desenvolvimento embrionário, assim como em outros períodos da vida, as alterações epigenéticas podem levar a doenças ou transtornos psiquiátricos (Ignácio *et al.*, 2014).

Estudos mostram evidências de que mudanças epigenéticas a partir do estresse de longo prazo podem ser transmitidas para as gerações futuras, destacando a epigenética intergeracional (Chan *et al.*, 2020; Heard e Martienssen, 2014; Koenig *et al.*, 2018). Para serem transmitidas de uma geração para outra, as alterações epigenéticas precisam resistir aos processos normais de regulação epigenética, que controlam a transcrição de genes. Porém,

quando uma alteração epigenética é removida ou apagada, fatores de ação tanto "cis" quanto "trans" podem reinstalá-la. Esses termos se referem a elementos no próprio gene (cis) ou em locais distantes (trans) que podem influenciar a regulação epigenética. Portanto, mesmo que uma alteração seja removida, ainda existe a possibilidade de que ela seja reintroduzida pelos fatores apropriados. Outro ponto a ser considerado é que certas regiões do DNA podem ser mais propensas a adquirir ou perder metilação devido às características específicas de sua sequência. Portanto, a metilação do DNA interage com diversos fatores associados para ser transmitida para as próximas gerações (Stenz *et al.*, 2018).

Estudos indicam que o estresse materno durante a gravidez pode contribuir para a transmissão de sintomas de ansiedade (Gleason *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2016), assim como o estresse parental antes da concepção pode contribuir para mudanças comportamentais na prole de roedores (Gapp *et al.*, 2014; Mychasiuk *et al.*, 2013) e ansiedade na prole de peixes (McGhee e Bell, 2014), sendo ambas as contribuições a partir de mecanismos epigenéticos intergeracionais.

Um estudo analisou a associação entre a exposição das mães a experiências adversas na infância e a metilação do DNA em todo o genoma em recém-nascidos. Os resultados indicam que a exposição das mães a experiências adversas na infância está associada à metilação diferencial, principalmente hipermetilação, em 5 locais CpG no sangue do cordão umbilical de bebês do sexo masculino. Esses locais CpG estão em áreas genéticas que provavelmente afetam a expressão gênica, como promotores, ilhas CpG e regiões próximas a ilhas CpG. Eles estão localizados em genes relacionados à função mitocondrial e em um gene, DOCK10, que é essencial para a morfogênese da coluna dendrítica em neurônios do hipocampo, e inclusive é proposto como biomarcador para depressão (Scorza *et al.*, 2023).

### 3.3 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL E TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

O estresse estimula o eixo HHA, induzindo a liberação de glicocorticóides, como o cortisol, pela adrenal. Os glicocorticóides desempenham um papel regulatório no metabolismo energético e no sistema imunológico. Quando o estímulo estressante cessa, o mecanismo de retroalimentação negativa inibe a continuidade de sua liberação pelo eixo. Porém, no estresse prolongado e no TDM pode ocorrer um fenômeno de resistência aos glicocorticóides, prejudicando o mecanismo de retroalimentação negativa sobre o eixo HHA

(Bertollo, Mingoti, *et al.*, 2024). Isso leva a um aumento nos níveis de cortisol nos indivíduos com o transtorno, o que pode interferir na sobrevivência neuronal e na neurogênese (Zajkowska *et al.*, 2022).

Estudos observaram que o eixo HHA continua a responder inadequadamente a situações de estresse em indivíduos com TDM recorrente em remissão. Esses pacientes também apresentam concentrações elevadas de cortisol, independentemente da presença de estresse psicossocial. Essa hiperatividade também pode contribuir para o aumento de citocinas inflamatórias na circulação sistêmica, o que pode promover a neuroinflamação, neurodegeneração e o próprio TDM (Bertollo, Mingoti, *et al.*, 2024; Catena-Dell'Osso *et al.*, 2013).

Maus tratos na infância induziram alterações na função do eixo HHA, com indicação de resistência aos glicocorticóides, tanto em mães que sofreram abuso, quanto em seus filhos, mostrando evidências de herdabilidade de modificações epigenéticas (Koenig *et al.*, 2018). Em indivíduos com TDM e síndrome coronariana aguda, a metilação do gene do GR esteve relacionada com a presença de sintomas depressivos, e os indivíduos com níveis mais altos de metilação apresentaram uma maior probabilidade de ter TDM em comparação com aqueles com níveis mais baixos de metilação (Kang *et al.*, 2019, p. 209). Em relação à resistência aos glicocorticóides, um fator importante a ser considerado é que esta alteração está entrelaçada com prejuízos no balanço oxidativo e aumento de inflamação e neuroinflamação (Ignácio *et al.*, 2019).

Um dos alvos investigados na resistência aos glicocorticóides é a FKBP51, uma imunofilina de 51 kDa codificada pelo gene FKBP5, cuja expressão é regulada pelo GR ativado. Essa proteína tem um papel relevante nos mecanismos de resistência aos glicocorticóides (Jiang *et al.*, 2019). A FKBP51 faz parte de um complexo proteico citoplasmático, onde sua função principal é impedir a translocação do GR para o núcleo, retendo-o no citoplasma. O GR, por sua vez, é codificado pelo gene receptor nuclear da subfamília 3, grupo C, membro 1 (NR3C1).

Os genes NR3C1 e FKBP5 desempenham papéis cruciais na regulação do eixo HHA e estão diretamente relacionados à resposta ao estresse e ao TDM. O GR medeia os efeitos do cortisol, um hormônio liberado em resposta ao estresse, enquanto a FKBP51 atua como um regulador negativo, inibindo a translocação do GR para o núcleo. Estudos demonstram que a expressão elevada de FKBP5 está correlacionada com transtornos psiquiátricos, incluindo o TDM e o transtorno de estresse pós-traumático. Em um estudo recente, a deleção de FKBP5

no hipocampo resultou em resistência à depressão induzida por estresse, evidenciando a importância desse gene na mediação das alterações sinápticas associadas à ativação do GR, pois a ausência de FKBP5 sugere insensibilidade à ativação do GR e minimiza as mudanças na transmissão sináptica, resultando em resiliência ao estresse (Zhang *et al.*, 2022). Estudos indicam que a redução na sensibilidade é um mecanismo compensatório frente à exposição crônica aos glicocorticóides, o que mantém o eixo HHA hiperativo em situações de estresse prolongado (Holsboer, 2000; Pariante e Miller, 2001).

Diversos estudos indicam alterações nas expressões gênicas (de FKBP5 e NR3C1) e protéicas (de FKBP51 e GR) no TDM e, em especial, em situações de estresse crônico, podendo estar relacionadas ao aumento (Guidotti *et al.*, 2013; Hartmann *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2019) ou redução na expressão (López *et al.*, 1998; Schiele *et al.*, 2016). Essa discrepância nos achados sugere que os efeitos do estresse crônico sobre o eixo HHA podem variar dependendo de fatores como o modelo experimental utilizado, as condições específicas do estudo e as características individuais dos participantes.

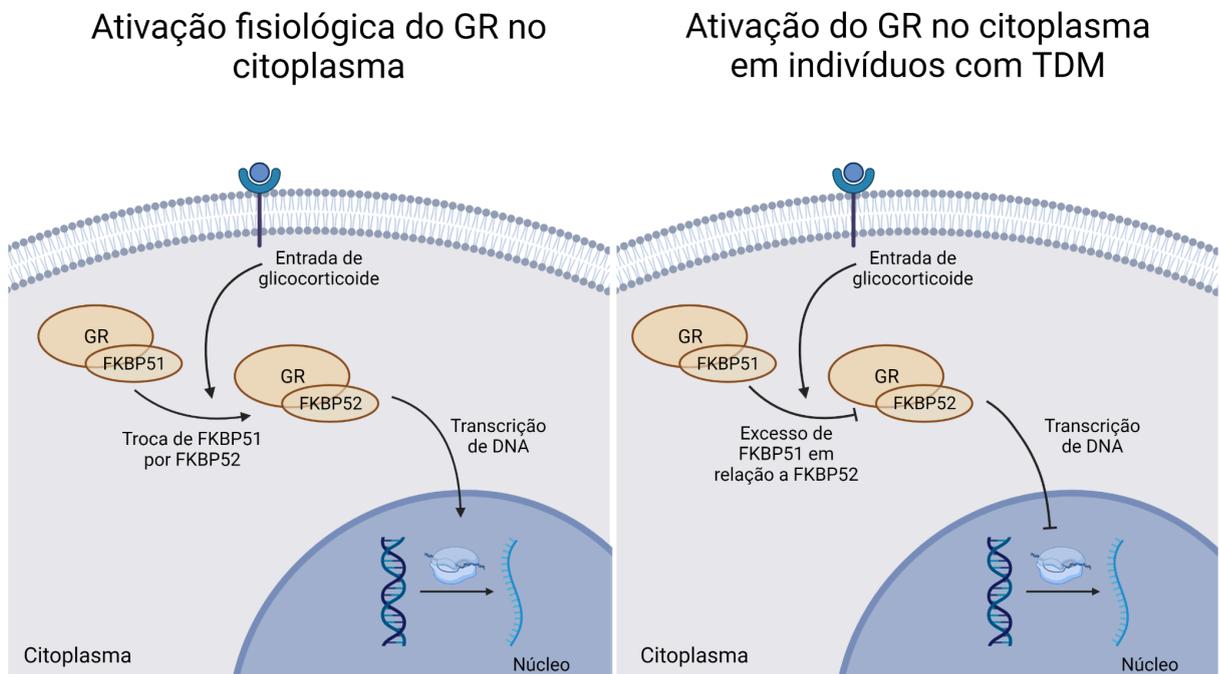
Alguns estudos apontam aumento na expressão gênica de FKBP5 e alterações na expressão de GR no hipocampo e no córtex pré-frontal em modelos de estresse crônico e comportamentos tipo depressivos (Guidotti *et al.*, 2013; Hartmann *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2019). Além disso, polimorfismos de FKBP5 estão relacionados a um aumento na recorrência de episódios depressivos e a uma resposta mais rápida aos tratamentos antidepressivos (Binder, 2009; Fujii *et al.*, 2014; Szczepankiewicz *et al.*, 2014). Essas variações genéticas afetam a expressão de FKBP51 e GR, influenciando a regulação do eixo HHA durante os episódios depressivos. Além disso, foi identificado que o impacto dos polimorfismos de FKBP5 na reatividade do eixo HHA e na expressão gênica é dependente da idade. Indivíduos mais velhos que possuem variantes específicas de FKBP5 apresentam maior supressão da resposta ao cortisol e mudanças na expressão de mRNA de GR e FKBP51, o que pode se assemelhar a fenótipos observados em distúrbios relacionados ao estresse (Fujii *et al.*, 2014).

Por outro lado, evidências sugerem que há redução da expressão do gene NR3C1 no córtex frontal (camadas III–VI), córtex temporal inferior (camada IV), córtex entorrinal (camadas III e VI), hipocampo (giro dentado, CA4, CA3 e CA1) e subículo de indivíduos com TDM, associado a uma redução da proteína GR, além de níveis reduzidos de miRNA do GR em diversas regiões cerebrais (López *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 2002). A diminuição da expressão do GR sugere menor sensibilidade ao cortisol, enquanto a redução do FKBP51 pode ser vista como um mecanismo compensatório, pois o FKBP51 inibe a ativação do GR e,

assim, interfere na regulação da produção de cortisol (Brix *et al.*, 2022). Essa redução na expressão de GR e FKBP51, especialmente em condições de estresse crônico, pode impactar a regulação emocional e o processamento de recompensas, afetando a neuroplasticidade e a conectividade sináptica, o que reforça a ideia de que essa diminuição representa uma resposta adaptativa ao estresse prolongado (Freimer *et al.*, 2022) com o objetivo de aumentar a resiliência ao estresse (Zhang *et al.*, 2022).

Além disso, microRNAs específicos, como miR-124a, miR-18a e miR-511, regulam a expressão de GR e FKBP51. Alterações induzidas por estresse nesses microRNAs contribuem para a desregulação de GR e FKBP51, implicando ainda mais esses fatores na suscetibilidade ao TDM. Essas evidências reforçam a complexidade das interações genéticas e epigenéticas no contexto do TDM e suas implicações para o tratamento e a prevenção do transtorno (Xu *et al.*, 2019).

O complexo proteico que envolve a FKBP51 tem papel essencial na alta afinidade do GR pelos glicocorticoides (Echeverria e Picard, 2010). Quando o glicocorticoide se liga ao GR no complexo, ocorre uma substituição da FKBP51 (codificada pelo gene FKBP5) pela FKBP52 (codificada pelo gene FKBP4). Essa troca é crucial para que o receptor possa ser translocado para o núcleo, onde desencadeia a regulação da transcrição gênica (Davies, Ning e Sánchez, 2002). Tanto a FKBP51 quanto a FKBP52 competem pelo mesmo sítio de ligação no complexo, mas a FKBP52 possui maior afinidade pelo receptor ativado. Uma vez no núcleo, o GR funciona como um fator de transcrição de vários genes, incluindo o FKBP5, promovendo a produção de FKBP51. Isso aumenta sua concentração intracelular, elevando sua competitividade com a FKBP52. Durante situações de estresse, o aumento da liberação de glicocorticoides pode intensificar a produção de FKBP51, o que impede a eficiente translocação do GR para o núcleo. Como consequência, a retroalimentação negativa dos glicocorticoides sobre o eixo HHA pode ser prejudicada (Merkulov, Merkulova e Bondar, 2017) (Figura 1).



**Figura 1 - Ativação do GR no citoplasma de indivíduos com e sem TDM.** No citoplasma, o FKBP51 está associado ao GR e retém o receptor no citoplasma, impedindo sua translocação para o núcleo, onde ocorrem as funções de transcrição do hormônio glicocorticoide. Por outro lado, o FKBP52 compete com o FKBP51 pelo sítio de ligação no complexo proteico, e quando o hormônio se liga ao GR, o FKBP52 substitui o FKBP51, permitindo que o receptor seja transportado para o núcleo e realize suas funções de transcrição. No TDM há hiperativação do eixo HHA e portanto grande quantidade de glicocorticóides circulantes, gerando níveis aumentados de FKBP51 que estão associados a uma menor sensibilidade dos receptores de glicocorticóides aos seus ligantes, afetando a ação dos glicocorticóides e a retroalimentação negativa do eixo HHA. FKBP51 - Proteína de Ligação à FK506 de 51 kDa; FKBP52 - Proteína de Ligação à FK506 de 52 kDa; GR - Receptor de Glicocorticóide; HHA- Hipotálamo-Hipófise-Adrenal; TDM - Transtorno Depressivo Maior.  
Fonte: Traduzido de (Bertollo, Galvan, *et al.*, 2024)

Além dos genes que regulam a translocação do GR, estudos em humanos e roedores trazem evidências de que o estresse no início da vida está associado com aumentada metilação do gene NR3C1, o qual codifica o GR. Além disso, o estresse maternal antes da gestação também parece desencadear aumento de metilação do exon 1F do gene NR3C1 nos descendentes (Turecki e Meaney, 2016). O exon 1F em humanos é homólogo ao exon 17 em ratos, que é específico de neurônios (Moser *et al.*, 2007, p. 2; Turecki e Meaney, 2016).

Estudar o eixo HHA no NAc é importante devido ao seu papel na regulação do estresse, pois o NAc medeia as respostas emocionais e a ativação do HHA influencia a função do NAc, afetando comportamentos relacionados à recompensa e ao prazer (Nikbakhtzadeh *et al.*, 2023). A alteração do funcionamento do NAc em resposta à ativação do eixo HHA pode contribuir para a vulnerabilidade ao TDM e outros transtornos psiquiátricos em contextos de estresse crônico (Sinha, 2008). Além disso, o NAc é central no circuito de recompensa do

cérebro, e a modificação da sinalização dopaminérgica pelo HHA pode impactar a resposta a estímulos de recompensa (Volkow, Wang e Baler, 2011).

O estresse pode induzir alterações epigenéticas e neuroplásticas no NAc, influenciando a expressão de genes que regulam o comportamento, o que ressalta a importância do estudo do HHA nessa região para revelar como essas alterações ocorrem e suas consequências a longo prazo (Martins de Carvalho, Chen e Lasek, 2021). Além disso, entender a interação entre o HHA e o NAc pode auxiliar no desenvolvimento de intervenções terapêuticas para tratar distúrbios emocionais, como o uso de antidepressivos que visam regular a resposta ao estresse e a função dopaminérgica (Fox e Lobo, 2019). Em estudos com modelos animais, a manipulação do HHA resulta em comportamentos que mimetizam aspectos de distúrbios psiquiátricos humanos, permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes a essas condições (Dion, Muñoz e Franklin, 2022).

O estresse crônico no início da vida exerce um papel significativo nas alterações do eixo HHA no NAc, o que pode resultar em uma resistência aos glicocorticóides. Nesse contexto, são observadas mudanças epigenéticas em genes envolvidos na regulação do sistema de retroalimentação negativa do eixo, como FKBP5 e FKBP4, bem como no próprio gene responsável pela codificação do GR, o NR3C1. Vale ressaltar que essas alterações epigenéticas, decorrentes do estresse na fase inicial e ao longo da vida, têm a capacidade de serem transmitidas, podendo desencadear prejuízos comportamentais e biológicos de forma intergeracional. Esses processos genéticos e epigenéticos estão associados a efeitos biológicos adversos, tais como estresse oxidativo e inflamação, que desempenham um papel no TDM.

### 3.4 A *C. asiatica* E O TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

Considerando as possibilidades de alvos terapêuticos, é importante que, paralelamente aos protocolos de estresse e testes comportamentais, sejam investigados compostos ou estratégias de intervenção terapêutica. Neste sentido, alguns estudos vêm destacando a espécie medicinal *C. asiatica* como possibilidade de intervenção e efeito benéfico no TDM (Jana *et al.*, 2010) e na plasticidade neuronal, incluindo aumento de arborização dendrítica hipocampal (Lokanathan *et al.*, 2016).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece o uso de plantas medicinais e fitoterapia desde 2005, proporcionando alternativas terapêuticas à população, e reforçando a relevância de estudos na área (Ministério da Saúde, 2006). É importante citar que a *C.*

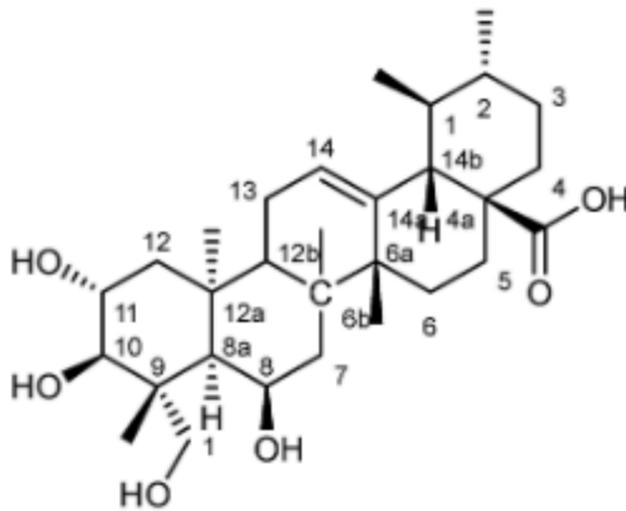
*asiatica* está seguramente presente em cosméticos utilizados por humanos (Johnson *et al.*, 2023).

Os efeitos aparentemente neuroprotetores envolvem diversos mecanismos moleculares e estruturais, envolvendo também ações benéficas sobre o eixo HHA, estresse oxidativo e inflamação (Lokanathan *et al.*, 2016). Em um estudo *in vitro*, os pesquisadores observaram que dois componentes ativos da espécie, os ácidos asiático e madecássico, funcionaram sinergisticamente, proporcionando efeitos semelhantes a fatores de crescimento na diferenciação neuronal (Lin, Huang e Hung, 2016).

Os ácidos asiático e madecássico, presentes nas folhas de *C. asiatica*, têm concentrações estimadas de 1.29 mg/g e 2.96 mg/g de peso fresco, respectivamente, o que corresponde a 1.44% e 3.29% de peso seco. O ácido asiático, portanto, representa uma quantidade significativa, enquanto o ácido madecássico se destaca como o composto de maior concentração entre os dois ácidos analisados (James e Dubery, 2011).

Um estudo recente observou que o asiaticosideo, um componente triterpenoide da *C. asiatica* exerceu efeito tipo antidepressivo em camundongos submetidos a estresse moderado crônico e reduziu a expressão de citocinas inflamatórias (Wang *et al.*, 2020). Outro estudo observou que o ácido madecássico exerceu um potente efeito na ativação da telomerase (Tsoukalas *et al.*, 2019). De forma geral, os estudos sobre os extratos e compostos ativos da *C. asiatica* sugerem sua relevância como estratégia farmacológica terapêutica para o TDM, bem como sua função em mecanismos biológicos subjacentes.

A literatura científica, até o momento, não possui informação sobre o efeito da *C. asiatica* e o ácido madecássico em mecanismos epigenéticos e resistência aos glicocorticoides. As pesquisas publicadas até o momento destacam a importância de novas investigações para preencher as lacunas de conhecimento e responder a questões fundamentais que permanecem em aberto. As estratégias propostas neste estudo têm como objetivo avaliar o efeito da planta e de um dos compostos ativos, o ácido madecássico (Figura 2). Os resultados obtidos poderão contribuir significativamente para o entendimento da fisiopatologia do TDM e para o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos destinados aos pacientes com transtornos depressivos graves e resistentes aos tratamentos convencionais disponíveis.



Ácido madecássico

**Figura 2 - Estrutura física do ácido madecássico.** Representação molecular do ácido madecássico, destacando as principais ligações e grupos funcionais presentes na estrutura.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 PREPARAÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO DE *C. asiatica*

As amostras de plantas de *C. asiatica* foram secas à temperatura ambiente ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ), trituradas em moinho de facas (Ciemlab®, CE430), selecionadas em peneira (425  $\mu\text{m}$ ; 35 Tyler/Mesch), identificadas e armazenadas com proteção contra a luz. Os extratos hidroalcoólicos foram produzidos através de maceração (5 dias) à temperatura ambiente, utilizando folhas moídas a seco da planta (100 g) e etanol a 70% (1:20, p/v). Após a filtração através do funil de Büchner, os extratos hidroalcoólicos foram concentrados via evaporação sob pressão reduzida, liofilizados, pesados e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ . A identificação botânica foi feita no Herbário da UNOCHAPECÓ onde uma exsicata foi depositada e tombada sob o número 4930.

O extrato hidroalcoólico de *C. asiatica* foi submetido a análises de injeção direta em fluxo realizadas no aparelho Thermo LTQ-XL acoplado a uma fonte de ionização por eletrospray e um analisador de armadilha de íons. A análise foi realizada em modo negativo a uma temperatura capilar de  $280^\circ\text{C}$ , uma voltagem de lente de tubo de  $-200\text{ V}$ ,  $5,0\text{ kV}$  e  $3,5\ \mu\text{A}$  na fonte, 30 unidades de fluxo de gás arbitrárias e um fluxo de amostra de  $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ .

Fragmentações dos íons moleculares mais abundantes foram realizadas usando o método CID com hélio e uma energia de colisão de 30 eV.

#### 4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os animais foram provenientes do Biotério Setorial da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó - BIOCHUFFS. O experimento com o uso de animais foi realizado nas instalações do BIOCHUFFS. O referido centro possui uma infraestrutura de criação e experimentação registrada no Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA), com o CIAEP/CONCEA no. 02.0118.2019 e segue rigorosamente as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas. Os animais foram acondicionados em 5 (cinco) animais por caixa, exceto para os grupos que passaram pelo protocolo de IS por 30 dias, com ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00 às 19:00, com luz iniciando às 7:00), comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido à temperatura de 23±1°C. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os protocolos experimentais com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFFS, sob o protocolo CEUA/UFFS nº 1912270922 (ID 000435) (Anexo A).

#### 4.3 PRIVAÇÃO MATERNAL E ISOLAMENTO SOCIAL

A PM consistiu na remoção dos filhotes da gaiola da mãe durante 3 h/dia nos primeiros 10 (dez) dias após o nascimento. Os animais não privados (controles) permaneceram imperturbáveis na gaiola original com a mãe. Após o décimo dia de PM, os animais permaneceram com suas respectivas mães até o vigésimo primeiro dia, quando os animais foram desmamados. O protocolo de IS foi iniciado no dia 50, e consistiu em manter cada animal condicionado em alojamento individual por um período de 30 dias. Os animais que não passaram pelo IS foram mantidos em 5 (cinco) animais por caixa (Djordjevic *et al.*, 2012).

#### 4.4 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

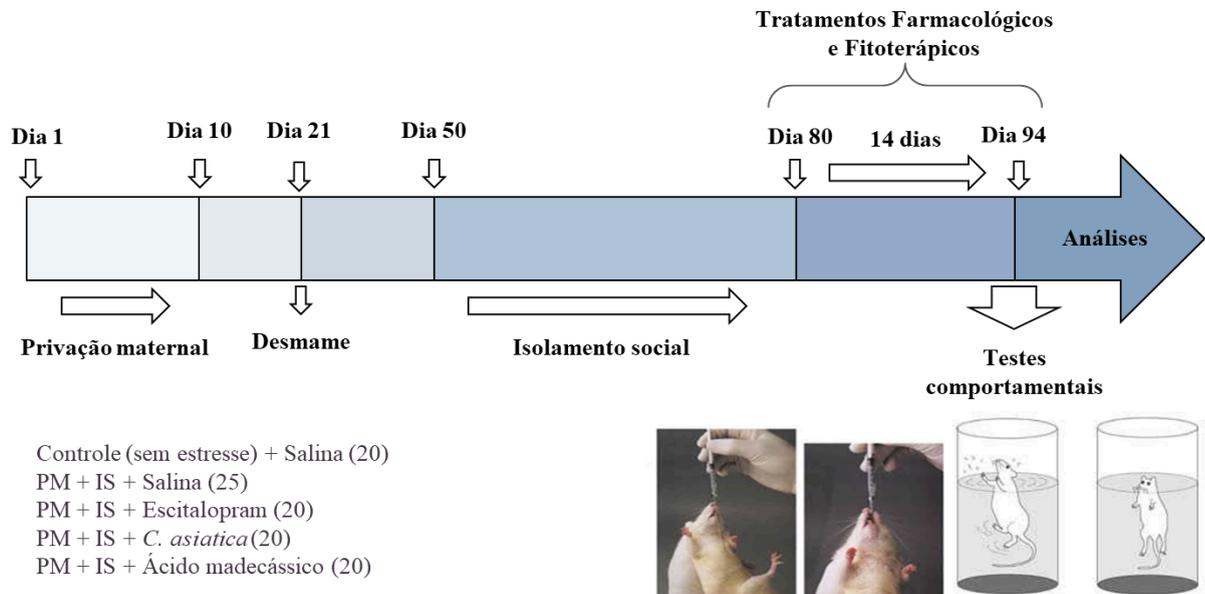
Após os 30 dias de IS, ou após o dia 80 no grupo controle, os animais foram submetidos ao tratamento crônico por 14 dias. Os animais foram tratados com salina (grupo controle de tratamento), extrato de *C. asiatica* (30mg/kg), composto ativo ácido madecássico (10mg/kg) ou escitalopram (10mg/kg) (controle positivo). Os animais foram organizados em grupos (N=20) de acordo com o protocolo de estresse e os tratamentos farmacológicos. O composto ativo ácido madecássico foi adquirido através da empresa Interprise Instrumentos Analíticos Ltda, sendo fabricado pela empresa Cayman Chemical, com sede nos Estados Unidos, estado do Michigan. O composto conta com pureza > 95%, apresentado em forma sólida cristalina, na quantidade de 1 grama / frasco.

A dose de escitalopram, antidepressivo clássico da classe dos ISRS da serotonina (Pałasz *et al.*, 2016), foi escolhida de acordo com estudos prévios disponíveis na literatura científica que utilizaram este fármaco como controle positivo em modelos animais (Farahbakhsh e Radahmadi, 2022; Firouzabadi *et al.*, 2021; Grolli *et al.*, 2023a; Seo *et al.*, 2017). A dose de 10 mg/kg de ácido madecássico (Devi, Balasundaram e Harikrishnan, 2020; Nasir *et al.*, 2015) e 30 mg/kg de *C. asiatica* (Bobade *et al.*, 2015; Boondam *et al.*, 2019) por dia, cronicamente, foi escolhida para este estudo por possuir efeitos neuromoduladores positivos em estudos disponíveis na literatura.

#### 4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

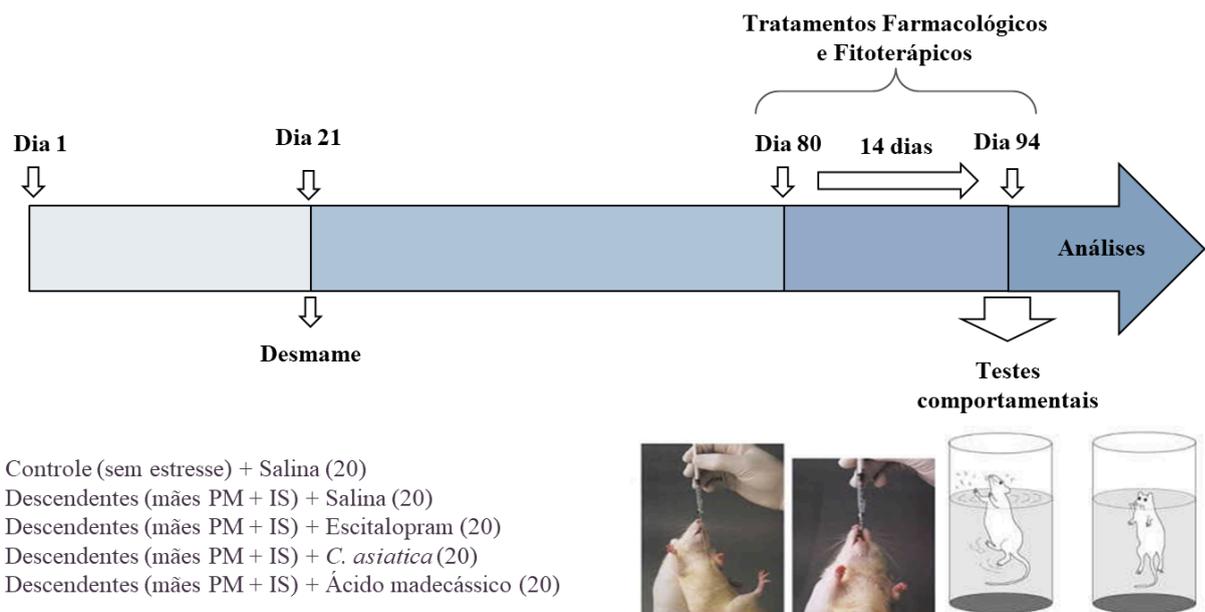
A primeira fase teve cinco grupos de animais, sendo eles: Sem estresse + Salina, PM + IS + Salina, PM + IS + Escitalopram (10mg/kg), PM + IS + *C. asiatica* (30mg/kg), PM + IS + Ácido madecássico (10mg/kg).

Cada grupo foi composto de 20 animais, sendo 10 machos e 10 fêmeas, com exceção do grupo PM + IS + Salina da fase um que envolveu 25 animais, sendo um N necessário, considerando que foi realizada a avaliação comportamental e análises bioquímicas de 10 fêmeas e garantido que tivessem mais 5 fêmeas desse grupo para o acasalamento dos animais da fase dois. Ao fim da fase I, essas 5 fêmeas do grupo PM + IS + Salina foram separadas para o acasalamento e os machos e demais fêmeas foram eutanasiados (Figura 3).



**Figura 3 - Desenho experimental da primeira fase.** Desenho experimental do protocolo de PM + IS, tratamentos farmacológicos e testes comportamentais da primeira fase do estudo.

A segunda fase envolveu 4 grupos de filhotes das 5 fêmeas da fase 1 separadas para acasalamento, sendo eles: PM + IS + Salina, PM + IS + Escitalopram, PM + IS + *C. asiatica*, e PM + IS + Ácido madecássico. Além disso, a segunda fase teve um grupo de filhotes controle, descendentes de animais que não passaram pelo estresse de PM e IS, totalizando 5 grupos de animais de cada sexo na segunda fase, cada um com 10 animais também (Figura 4).



**Figura 4 - Desenho experimental da segunda fase.** Desenho experimental dos tratamentos farmacológicos e testes comportamentais da segunda fase do estudo.

#### 4.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais da fase um, após completarem 94 dias de idade ou nos últimos dias de tratamento farmacológico, passaram por testes comportamentais. Após, todos os machos e uma parte das fêmeas foram sacrificados por decapitação e o NAc foi separado para as análises (Paxinos e Watson, 1986). Um grupo de fêmeas (N=5) foi separado para acasalamento dos descendentes, animais da fase dois. Os filhotes ficaram com essas mães até o desmame, no 21º dia. Após o desmame, as fêmeas foram sacrificadas por decapitação. Os animais desmamados foram acondicionados 5 animais por gaiola, machos e fêmeas em gaiolas separadas. Os filhos adultos dessas ratas foram tratados por 14 dias, protocolo iniciado após completarem a idade de 80 dias. Entre os dias 12 e 14 de tratamento, os animais foram submetidos aos mesmos testes comportamentais e análises bioquímicas dos grupos da primeira fase.

#### 4.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram realizados uma hora após os tratamentos farmacológicos. Foi realizado um teste de atividade locomotora durante cinco minutos no campo aberto, e o comportamento tipo depressivo foi avaliado pelo teste de natação forçada (Porsolt, Le Pichon e Jalfre, 1977).

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

O teste de natação forçada avaliou o comportamento tipo depressivo (Porsolt, 2000) (n = 20/grupo). Para realizar o teste, cada rato foi colocado individualmente em um cilindro com água à temperatura de 23°C preenchido com água suficiente para que o animal não conseguisse apoiar as patas no fundo. Este teste foi realizado em dois dias, sendo que no primeiro dia (13º dia de tratamento farmacológico) os ratos foram forçados a nadar durante 15 minutos (pré-teste), e no segundo dia do teste (14º dia de tratamento farmacológico) os ratos

foram forçados a nadar por 5 minutos, sendo que nesse momento foram avaliados os parâmetros de imobilidade, envolvendo imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar. Também foram avaliados parâmetros de mobilidade, como o tempo que o animal estará nadando e o tempo que ficará escalando as paredes do cilindro na tentativa de escapar do ambiente. Após o teste de natação, imediatamente os animais foram eutanasiados por decapitação para realizar a coleta das amostras de NAc.

#### 4.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A avaliação da expressão de RNAm dos genes FKBP5, codificador da proteína FKBP51, e NR3C1, codificador do GR, foi realizada pela técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase RT-PCR. A expressão foi normalizada utilizando o gene de referência gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), e a quantificação relativa foi feita por meio do cálculo de Delta-Delta Ct.

O GAPDH foi escolhido como gene de referência devido à sua expressão constitutiva, que não varia significativamente entre diferentes condições experimentais, e por estar presente em praticamente todas as células devido ao seu papel central na glicólise, o que garante sua aplicabilidade em uma ampla gama de amostras, inclusive em tecido cerebral (Barber *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 1999; Vandesomepele *et al.*, 2002).

O desenho dos primers está na tabela 1.

Tabela 1 - Sequências de primers usados para RT-PCR

Gene	Forward	Reverse
GAPDH (gene de referência)	TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA	GGTAACCAGGCGTCCGATAC
FKBP5 (codifica FKBP51)	G TTCAGCTGTGCAATCCAGA	AGGGTGTTCGTGTGCTCTTCAA
Nr3c1 (codifica GR)	GGGACACGAATGAGGATTG	CACACTGCTGGGACTTGAT

#### 4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados através da ANOVA de uma via e do teste *post-hoc* de Tukey. Foi considerado o  $p < 0,05$  como o nível de significância estatística. Para as análises

foi utilizado o software Prisma 9.3. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e significância estatística foi definida para valores de p de \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001.

Nos gráficos, foram usadas siglas para representar os grupos experimentais. Grupos da fase I: C+S (Controle + Salina), E+S (Estresse + Salina), E+E (Estresse + Escitalopram 10 mg/kg), E+Ca (Estresse + *C. asiatica* 30 mg/kg), e E+AM (Estresse + Ácido madecássico 10 mg/kg). Para a fase II, a sigla D foi usada para identificar os descendentes de mães que passaram por PM + IS, portanto os grupos foram identificados da seguinte forma: C+S (Controle + Salina), D+S (Descendentes + Salina), D+E (Descendentes + Escitalopram 10 mg/kg), D+Ca (Descendentes + *C. asiatica* 30 mg/kg), e D+AM (Descendentes + Ácido madecássico 10 mg/kg).

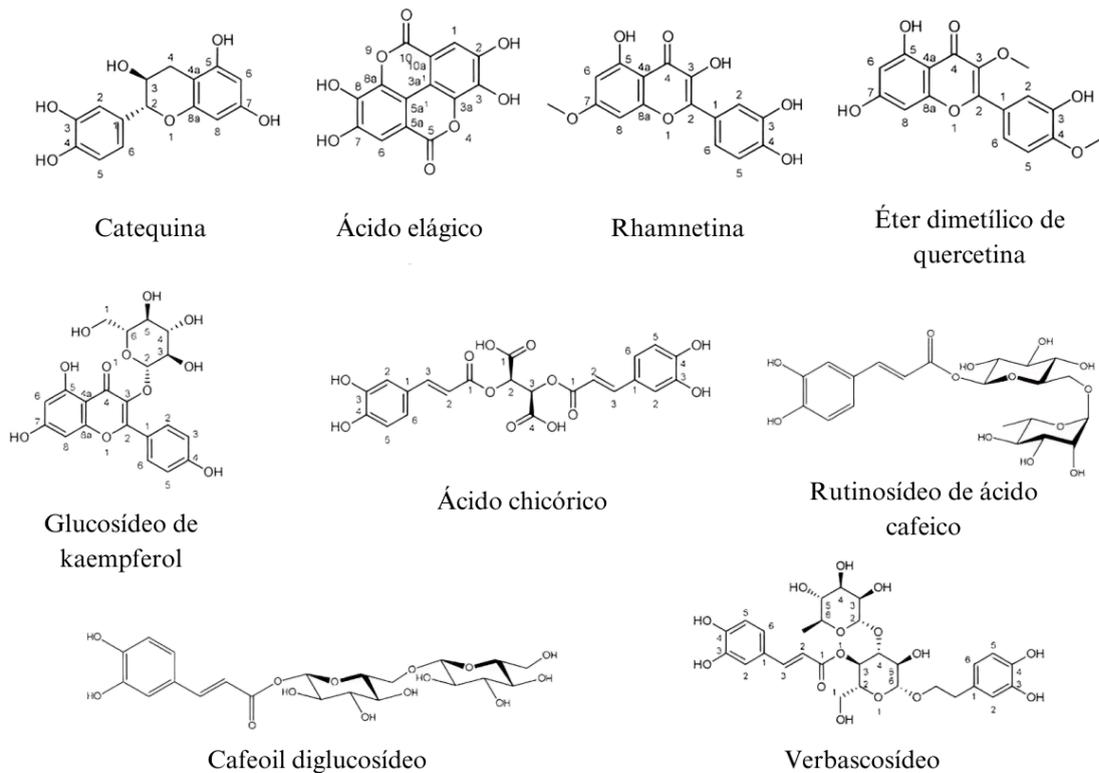
## 5. RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DOS COMPONENTES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *C. asiatica*

Os resultados da análise por espectrometria de massa do extrato hidroalcoólico de *C. asiatica* estão dispostos na Tabela 2 e a estrutura dos compostos estão representados na Figura 5. Devido a técnica utilizada não foi possível detectar ácido madecássico. No entanto, a análise dos modos negativo e positivo do concentrado revelou a presença de nove compostos, incluindo fitoconstituintes da classe antioxidante, como catequina e verbascosídeo.

**Tabela 2** - Análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *Centella asiatica* por meio de ensaios espectrométricos

Composto	[M-H] <sup>-</sup>	MS <sub>2</sub>	Referência
Catequina	289	187, 171, 161, 125	(De Souza <i>et al.</i> , 2008)
Ácido elágico	301	257, 272, 283	(Zanatta <i>et al.</i> , 2021)
Rhamnetina	315	300, 271, 165, 121	(Engels <i>et al.</i> , 2012)
Éter dimetílico de quercetina	329	314, 299, 285, 241	(Falcão <i>et al.</i> , 2013)
Glucosídeo de kaempferol	447	285, 241, 257, 267	(Zanatta <i>et al.</i> , 2021)
Ácido chicórico	473	311, 293, 179	(Zanatta <i>et al.</i> , 2021)
Rutinosídeo de ácido cafeico	487	469, 459, 441, 427, 179	(Engels <i>et al.</i> , 2012)
Cafeoil diglucosídeo	503	341, 179, 161, 143	(Vallverdú-Queralt <i>et al.</i> , 2011)
Verbascosídeo	623	461, 315, 179	(Attia <i>et al.</i> , 2018)

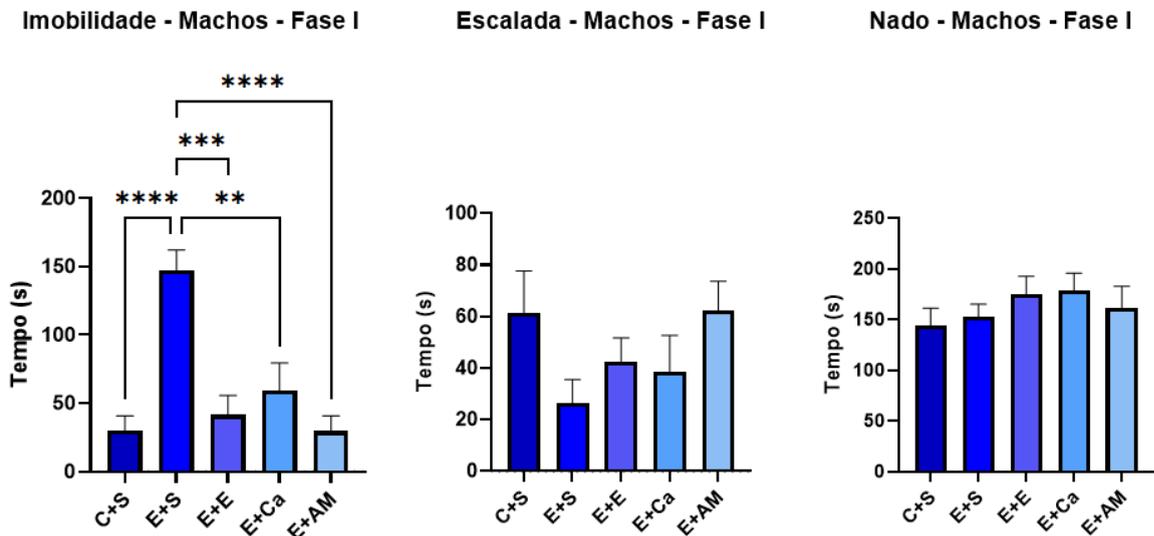


**Figura 5 - Estruturas químicas no extrato de *Centella asiatica*.** Estruturas químicas denotadas para o extrato hidroalcoólico de *C. asiatica* a partir da análise do extrato por análise de espectrometria de massa.

## 5.2 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO EM MACHOS DA FASE I

Os efeitos dos protocolos de PM e IS e dos tratamentos com extrato de *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada em machos (fase I) estão ilustrados na Figura 6. No protocolo de natação forçada a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa no tempo de imobilidade entre os grupos sem estresse e os grupos que passaram por PM e IS, e entre os tratamentos ( $F = 10,81$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste *post-hoc* de Tukey revelou as seguintes diferenças estatísticas: A PM+IS elevou significativamente o tempo de imobilidade ( $p < 0,0001$ ) no teste de natação forçada e os tratamentos com *C. asiatica* ( $p < 0,01$ ), ácido madecássico ( $p < 0,0001$ ) e escitalopram ( $p < 0,001$ ) reduziram significativamente ao nível do controle o efeito da PM e IS. Quanto aos parâmetros de escalada ( $F = 1,690$ ;  $p = 0,1677$ ) e

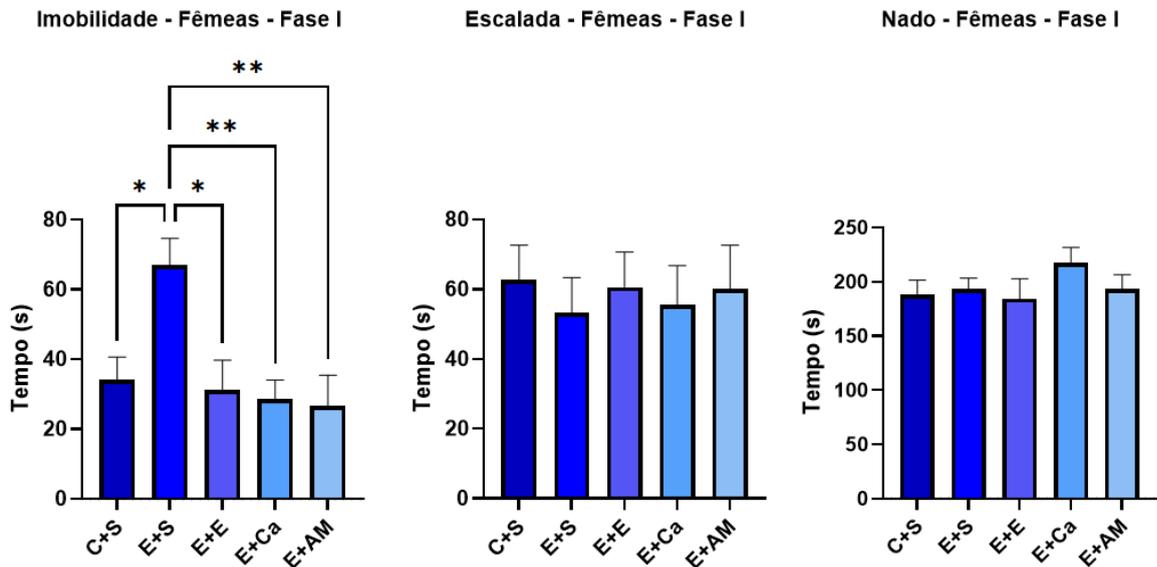
nado ( $F = 0,6891$ ;  $p = 0,6028$ ) no teste de nado forçado, não houve diferença estatística significativa entre os grupos.



**Figura 6 - Teste de natação forçada em machos fase I.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre os parâmetros de mobilidade no teste de natação forçada em machos (fase I). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e significância estatística foi definida para valores de  $p$  de  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  e  $****p < 0,0001$ . Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e E  $\rightarrow$  Estresse. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

### 5.3 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO EM FÊMEAS DA FASE I

Os efeitos dos protocolos de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada em fêmeas da fase I estão ilustrados na Figura 7. No protocolo de natação forçada a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa no tempo de imobilidade, entre os grupos sem estresse e os grupos privados matematicamente e entre os tratamentos ( $F = 4,735$ ;  $p = 0,0033$ ). O teste *post-hoc* de Tukey revelou as seguintes diferenças estatísticas: A PM elevou significativamente o tempo de imobilidade ( $p < 0,05$ ) no teste de natação forçada e os tratamentos com *C. asiatica* ( $p < 0,01$ ), ácido madecássico ( $p < 0,01$ ) e escitalopram ( $p < 0,05$ ) reduziram significativamente ao nível do controle o efeito da PM e IS. Quanto aos parâmetros de escalada ( $F = 0,1284$ ;  $p = 0,9714$ ) e nado ( $F = 0,8711$ ;  $p = 0,4879$ ) no teste de nado forçado, não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

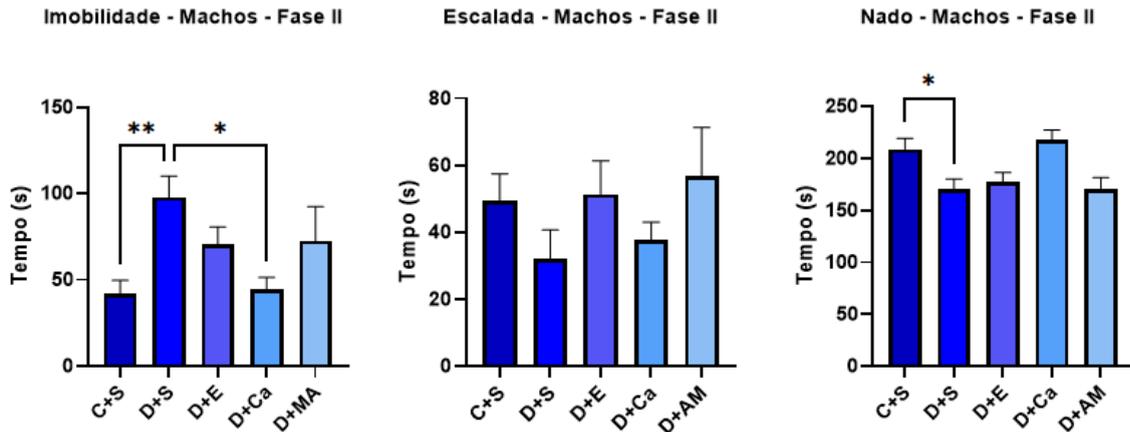


**Figura 7 - Teste de natação forçada em fêmeas fase I.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre os parâmetros de mobilidade no teste de natação forçada em fêmeas da fase I. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e significância estatística foi definida para valores de p de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e E  $\rightarrow$  Estresse. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

#### 5.4 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO EM MACHOS DA FASE II

Os efeitos intergeracionais dos protocolos de PM e IS nas mães e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada em machos da fase II estão ilustrados na Figura 8. No protocolo de natação forçada a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa no tempo de imobilidade, entre os grupos sem estresse e os grupos privados matematicamente e entre os tratamentos ( $F = 4,622$ ;  $p = 0,0022$ ). O teste *post-hoc* de Tukey revelou as seguintes diferenças estatísticas: Filhos de mães estressadas aumentaram significativamente o tempo de imobilidade ( $p < 0,01$ ) no teste de natação forçada e o tratamento com *C. asiatica* ( $p < 0,05$ ) reduziu significativamente este efeito, chegando ao nível do controle. Em relação ao tratamento com ácido madecássico, os resultados foram similares ao grupo com escitalopram. Quanto à escalada ( $F = 1,026$ ;  $p = 0,3995$ ), não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Em relação ao nado ( $F = 3,783$ ;  $p = 0,0075$ ), filhos de mães estressadas apresentaram uma redução significativa no tempo de nado ( $p <$

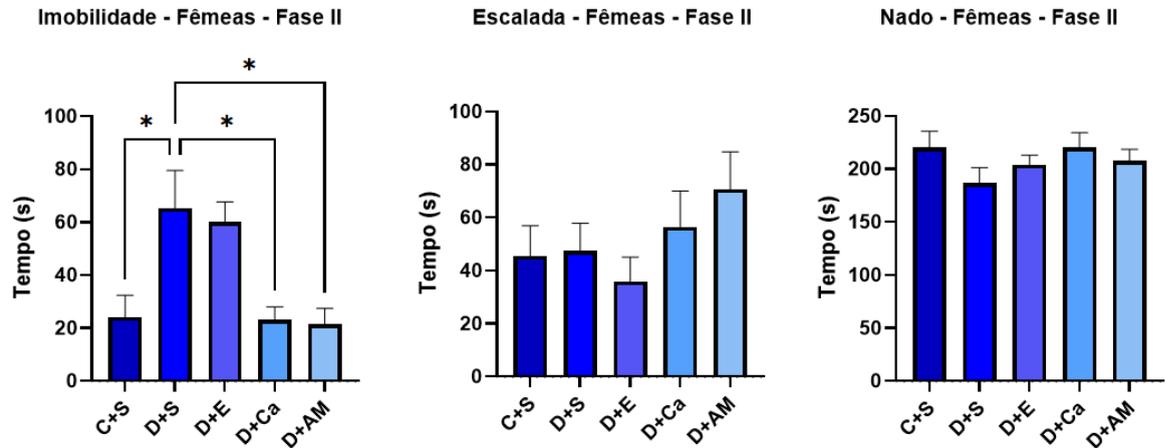
0,05). O tratamento com *C. asiatica* tendeu a reverter esta alteração, porém sem diferença estatística significativa ( $p = 0.0611$ ).



**Figura 8 - Teste de natação forçada em machos fase II.** Efeitos intergeracionais dos protocolos de PM e IS nas mães e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada em descendentes machos da fase II. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e significância estatística foi definida para valores de  $p$  de  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ . Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e D  $\rightarrow$  Descendentes. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

## 5.5 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NADO FORÇADO EM FÊMEAS DA FASE II

Os efeitos intergeracionais dos protocolos de PM e IS nas mães e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada em fêmeas da fase II estão ilustrados na Figura 9. No protocolo de natação forçada a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa no tempo de imobilidade, entre os grupos sem estresse e os descendentes de grupos privados matematicamente e entre os tratamentos ( $F = 5,158$ ;  $p = 0,0013$ ). O teste *post-hoc* de Tukey revelou as seguintes diferenças estatísticas: Descendentes de mães estressadas aumentaram significativamente o tempo de imobilidade ( $p < 0,05$ ) no teste de natação forçada e os tratamentos com *C. asiatica* ( $p < 0,05$ ) e ácido madecássico ( $p < 0,05$ ) reduziram significativamente o tempo de imobilidade, alcançando o nível do controle. Quanto aos parâmetros de escalada ( $F = 1,278$ ;  $p = 0,2893$ ) e nado ( $F = 1,171$ ;  $p = 0,3332$ ) no teste de nado forçado, não houve diferença estatística significativa entre os grupos.



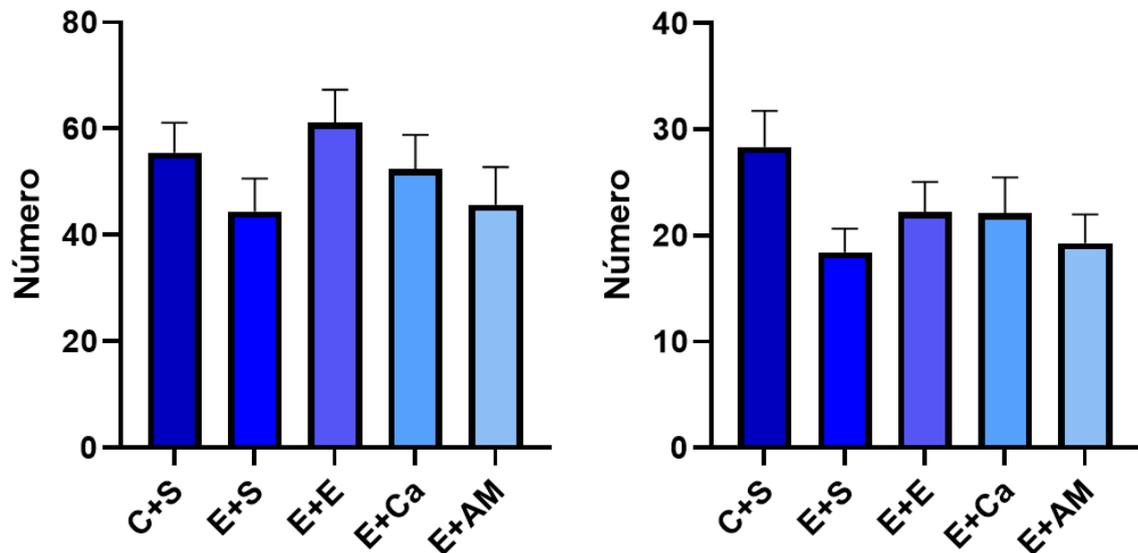
**Figura 9 - Teste de natação forçada em fêmeas fase II.** Efeitos intergeracionais dos protocolos de PM e IS nas mães e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada em descendentes fêmeas da fase II. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e significância estatística foi definida para valores de p de  $*p < 0,05$ . Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e D  $\rightarrow$  Descendentes. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

## 5.6 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM MACHOS DA FASE I

Os efeitos dos protocolos de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto em machos (fase I) estão ilustrados na Figura 10. No teste de campo aberto a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre os grupos sem estresse e os grupos que passaram por PM e IS. Tanto os protocolos de PM e IS quanto os tratamentos não induziram alterações significativas na atividade locomotora, avaliada através dos números de cruzamentos ( $F = 1,197$ ;  $p = 0,3233$ ) e levantamentos ( $F = 1,797$ ;  $p = 0,1434$ ) no teste do campo aberto.

**Cruzamentos - Machos - Fase I**

**Levantamentos - Machos - Fase I**

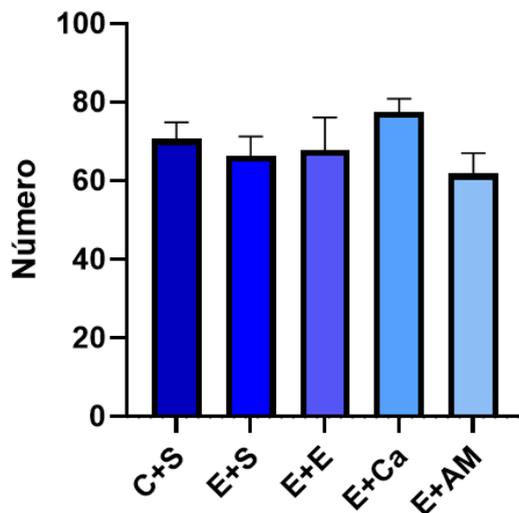


**Figura 10 - Atividade locomotora no campo aberto em machos fase I.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória em machos (fase I). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e E  $\rightarrow$  Estresse. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

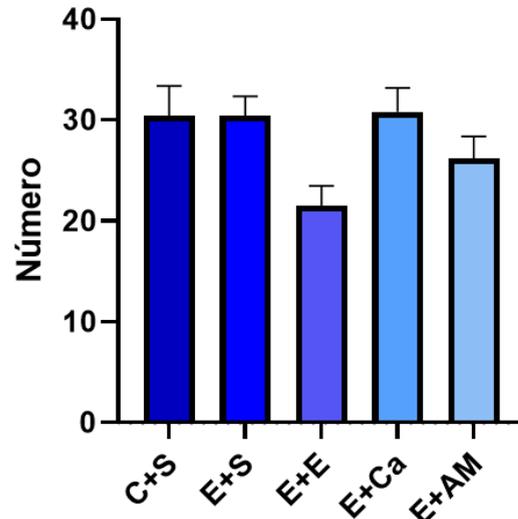
### 5.7 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM FÊMEAS DA FASE I

Os efeitos dos protocolos de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto em fêmeas (fase I) estão ilustrados na Figura 11. No teste de campo aberto a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre os grupos sem estresse e os grupos que passaram por PM e IS. Tanto os protocolos de PM e IS quanto os tratamentos não induziram alterações significativas na atividade locomotora, avaliada através dos números de cruzamentos ( $F = 1,173$ ;  $p = 0,3334$ ) e levantamentos ( $F = 2,937$ ;  $p = 0,0297$ ) no teste do campo aberto.

**Cruzamentos - Fêmeas - Fase I**



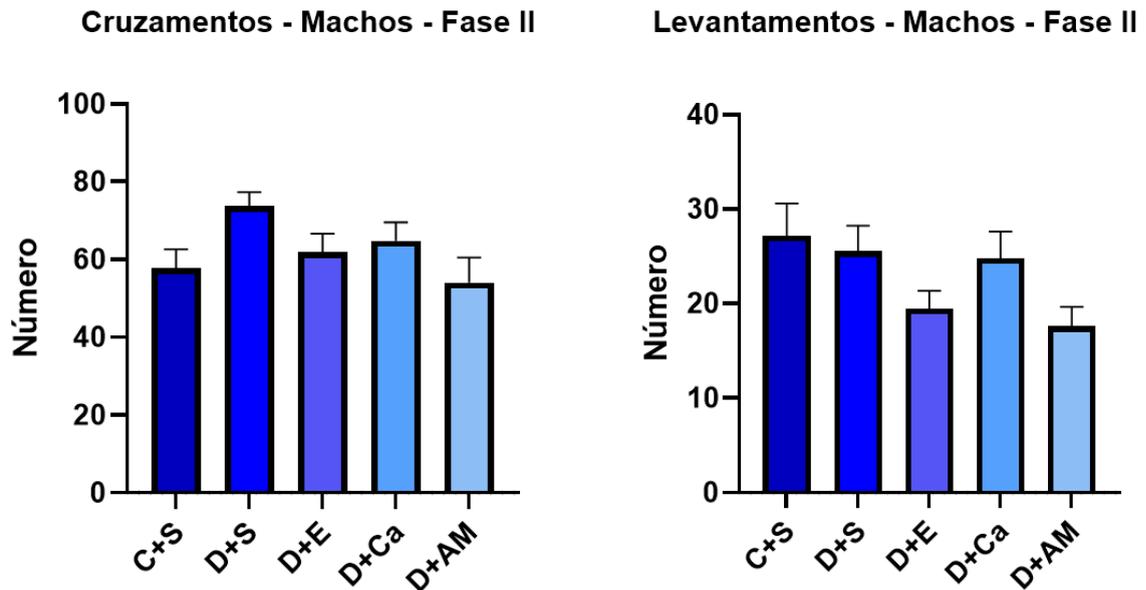
**Levantamentos - Fêmeas - Fase I**



**Figura 11 - Atividade locomotora no campo aberto em fêmeas fase I.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória em fêmeas (fase I). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e E  $\rightarrow$  Estresse. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

## 5.8 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM MACHOS DA FASE II

Os efeitos intergeracionais dos protocolos de PM e IS nas mães e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto em machos (fase II) estão ilustrados na Figura 12. No teste de campo aberto a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre o grupo controle e o grupo com mães que sofreram PM e IS. Tanto o estresse nas mães quanto os tratamentos não induziram alterações significativas na atividade locomotora, avaliada através dos números de cruzamentos ( $F = 2,298$ ;  $p = 0,0721$ ) e levantamentos ( $F = 2,321$ ;  $p = 2,321$ ) no teste do campo aberto.



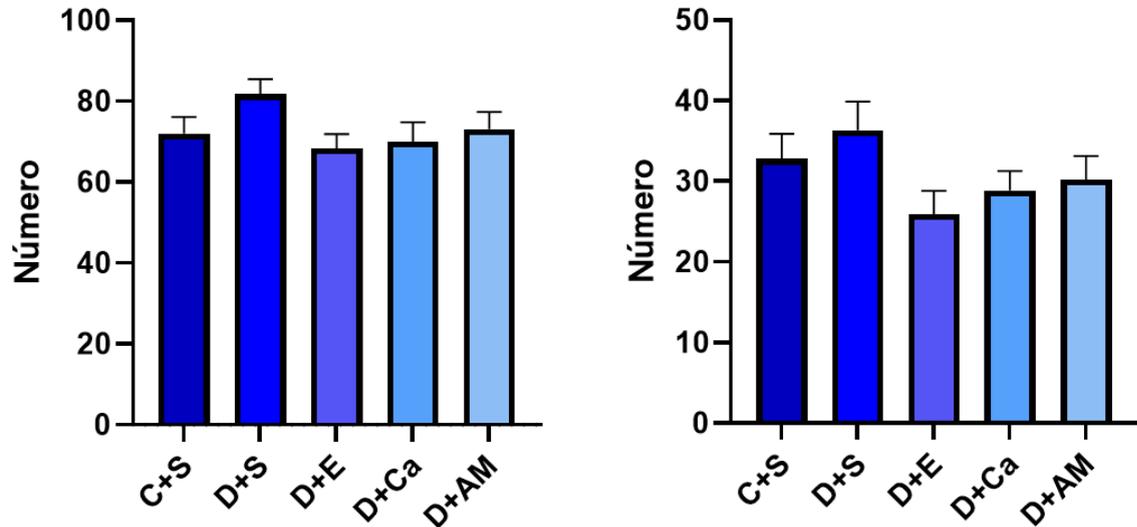
**Figura 12 - Atividade locomotora no campo aberto em machos fase II.** Efeitos intergeracionais dos protocolos de PM e IS nas mães e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória em descendentes machos (fase II). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e D  $\rightarrow$  Descendentes. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

### 5.9 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM FÊMEAS DA FASE II

Os efeitos intergeracionais dos protocolos de PM e IS nas mães e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de campo aberto em fêmeas (fase II) estão ilustrados na Figura 13. No teste de campo aberto a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre o grupo controle e o grupo com mães que sofreram PM e IS. Tanto o estresse nas mães quanto os tratamentos não induziram alterações significativas na atividade locomotora, avaliada através dos números de cruzamentos ( $F = 1,557$ ;  $p = 0,1991$ ) e levantamentos ( $F = 1,759$ ;  $p = 0,1507$ ) no teste do campo aberto.

**Cruzamentos - Fêmeas - Fase II**

**Levantamentos - Fêmeas - Fase II**

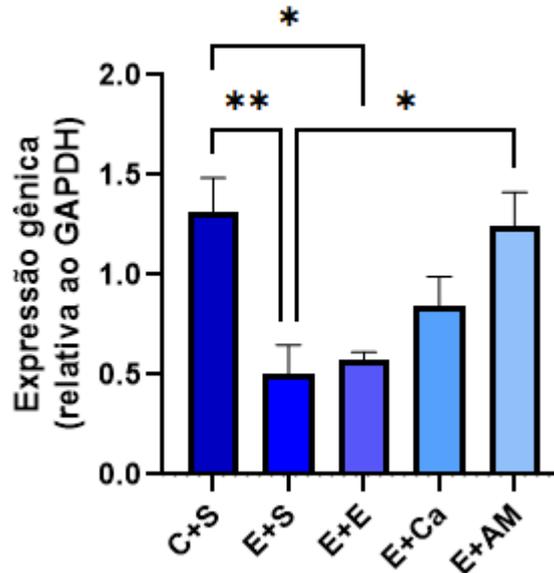


**Figura 13 - Atividade locomotora no campo aberto em fêmeas fase II.** Efeitos intergeracionais dos protocolos de PM e IS nas mães e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória em descendentes fêmeas (fase II). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e D  $\rightarrow$  Descendentes. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

#### 5.10 EFEITOS DA PM + IS, E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE NR3C1 NO NAc DE MACHOS DA FASE I

Os efeitos dos protocolos de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de NR3C1 em machos (fase I) estão ilustrados na Figura 14. Na análise dos resultados do PCR, a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa na expressão gênica de NR3C1 entre os grupos sem estresse e os grupos submetidos à PM + IS, e entre os tratamentos ( $F = 6,146$ ;  $p = 0,0045$ ). O teste *post-hoc* de Tukey indicou que o protocolo de PM + IS culminou em redução significativa da expressão gênica de NR3C1 ( $p = 0,0082$ ), assim como o grupo que passou por PM + IS e foi tratado com escitalopram ( $p = 0,0375$ ). O tratamento com *C. asiatica*, teve efeito melhor que o escitalopram, apesar de o resultado não ter chegado a um nível de significância estatística. O tratamento com ácido madecássico ( $p = 0,0277$ ) reduziu significativamente o efeito da PM + IS, aumentando a expressão gênica ao nível do controle.

### NR3C1 - Machos - Fase I

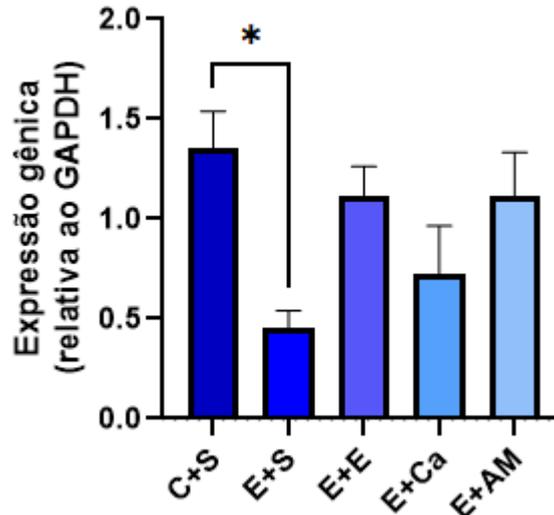


**Figura 14 - Expressão gênica de NR3C1 no NAc de machos fase I.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de NR3C1 no NAc de machos (fase I). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e significância estatística foi definida para valores de p de \* $p < 0,05$ , e \*\* $p < 0,01$ . Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e E  $\rightarrow$  Estresse. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

#### 5.11 EFEITOS DA PM + IS, E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE NR3C1 NO NAc DE FÊMEAS

Os efeitos dos protocolos de PM + IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de NR3C1 em fêmeas (fase I) estão ilustrados na Figura 15. Na análise dos resultados do PCR, a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa na expressão gênica de NR3C1 entre os grupos sem estresse e o grupo PM + IS, e entre os tratamentos ( $F = 3,781$ ;  $p = 0,0359$ ). O teste *post-hoc* de Tukey indicou que o protocolo de PM + IS reduziu significativamente a expressão gênica de NR3C1 ( $p = 0,0367$ ). Os tratamentos, embora tenham aumentado a expressão, não chegaram a um nível de significância estatística (Escitalopram:  $p = 0,1232$ ; *C. asiatica*:  $p = 0,8428$ ; Ácido madecássico:  $p = 0,1566$ ).

### NR3C1 - Fêmeas - Fase I

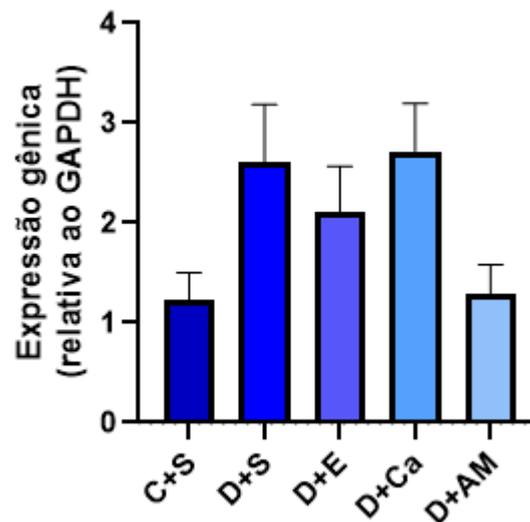


**Figura 15 - Expressão gênica de NR3C1 no NAc de fêmeas fase I.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de NR3C1 no NAc de fêmeas (fase I). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ . Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e E  $\rightarrow$  Estresse. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

#### 5.12 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE NR3C1 EM MACHOS DA FASE II

Os efeitos dos protocolos de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de NR3C1 em machos (fase II) estão ilustrados na Figura 16. Na análise dos resultados do PCR, a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre os grupos sem estresse e os grupos que passaram por PM e IS, assim como os grupos com tratamento ( $F = 2,651$ ;  $p = 0,0745$ ). Apesar disso, é possível identificar que a expressão gênica de NR3C1 teve uma tendência a aumentar nos grupos descendentes, em relação ao grupo controle.

## NR3C1 - Machos - Fase II

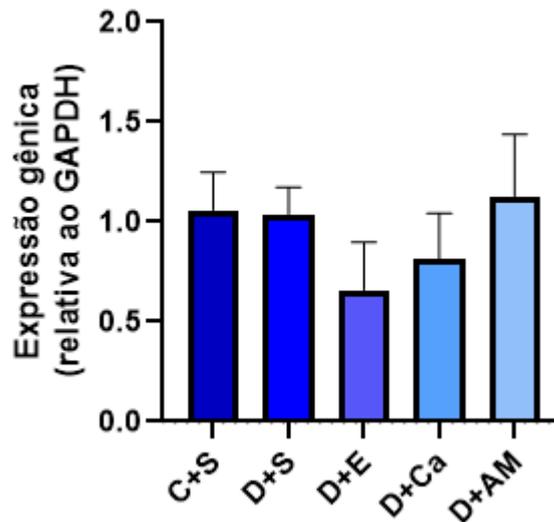


**Figura 16 - Expressão gênica de NR3C1 no NAc de machos fase II.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de NR3C1 no NAc de machos (fase II). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e D  $\rightarrow$  Descendentes. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

### 5.13 EFEITOS DA PM, IS, E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE NR3C1 EM FÊMEAS DA FASE II

Os efeitos dos protocolos de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de NR3C1 em fêmeas (fase II) estão ilustrados na Figura 17. Na análise dos resultados do PCR, a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre os grupos sem estresse e os grupos que passaram por PM e IS, assim como os grupos com tratamento ( $F = 0,7658$ ;  $p = 0,5612$ ).

## NR3C1 - Fêmeas - Fase II

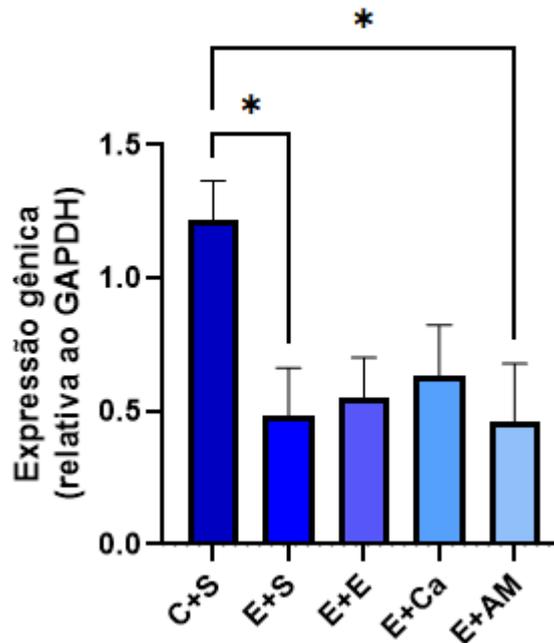


**Figura 17 - Expressão gênica de NR3C1 no NAc de fêmeas fase II.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de NR3C1 no NAc de fêmeas (fase II). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e D  $\rightarrow$  Descendentes. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

### 5.14 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FKBP5 NO NAc DE MACHOS FASE I

Os efeitos dos protocolos de PM + IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de FKBP5 em machos da fase I estão ilustrados na Figura 18. Na análise dos resultados do PCR a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa na expressão gênica de FKBP5 entre os grupos sem estresse e o grupo PM + IS, e entre os tratamentos ( $F = 3,823$ ;  $p = 0,0215$ ). O teste *post-hoc* de Tukey indicou que o protocolo de PM + IS reduziu significativamente a expressão gênica de FKBP5 ( $p = 0,0491$ ), assim como o grupo que passou por PM + IS e foi tratado com ácido madecássico ( $p = 0,0409$ ). O tratamento com *C. asiatica* ficou similar ao tratamento com escitalopram.

### FKBP5 - Machos - Fase I

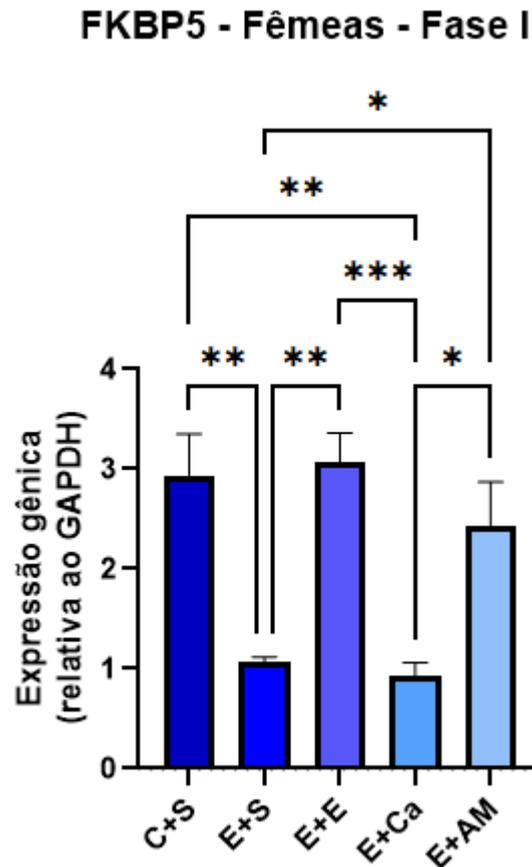


**Figura 18 - Expressão gênica de FKBP5 no NAc de machos fase I.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de FKBP5 no NAc de machos (fase I). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ . Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e E  $\rightarrow$  Estresse. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

#### 5.15 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FKBP5 NO NAc DE FÊMEAS FASE I

Os efeitos dos protocolos de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de NR3C1 em fêmeas (fase I) estão ilustrados na Figura 19. Na análise dos resultados do PCR a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa na expressão gênica de FKBP5 entre os grupos sem estresse e os grupos privados maternalmente e entre os tratamentos ( $F = 12,29$ ;  $p = 0,0002$ ). O teste *post-hoc* de Tukey indicou que o protocolo de PM e IS reduziu significativamente a expressão gênica de FKBP5 ( $p = 0,0058$ ), assim como o grupo que passou por PM e IS e foi tratado com *C. asiatica* ( $p = 0,0031$ ). Os tratamentos com escitalopram ( $p = 0,0017$ ) e ácido madecássico ( $p = 0,0313$ ) reverteram o efeito da PM e IS. Além disso, o tratamento com *C. asiatica* reduziu a expressão gênica de FKBP5 em relação

ao grupo controle ( $p = 0,0031$ ), grupo escitalopram ( $p = 0,0009$ ) e grupo ácido madecássico ( $p = 0,0158$ ).

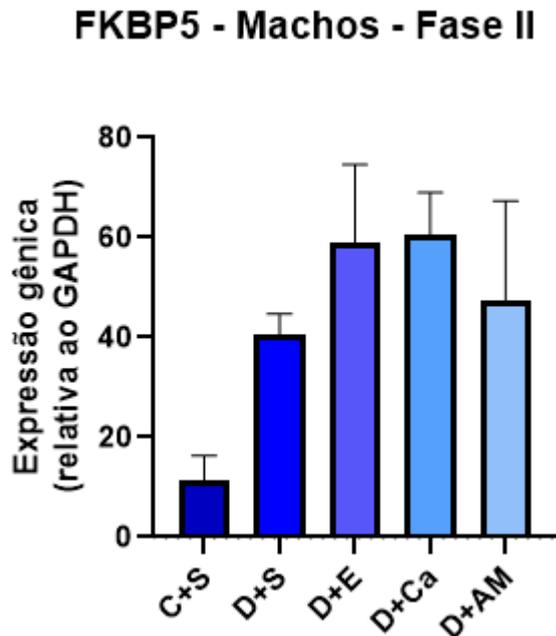


**Figura 19 - Expressão gênica de FKBP5 no NAc de fêmeas fase I.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de FKBP5 no NAc de fêmeas (fase I). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, e significância estatística foi definida para valores de  $p$  de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , e \*\*\* $p < 0,001$ . Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e E  $\rightarrow$  Estresse. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

#### 5.16 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FKBP5 NO NAc DE MACHOS DA FASE II

Os efeitos dos protocolos de PM + IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de FKBP5 em machos (fase II) estão ilustrados na Figura 20. Na análise dos resultados do PCR a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre os grupos sem estresse e os

grupos que passaram por PM + IS, assim como os grupos com tratamento ( $F = 2,623$ ;  $p = 0,0985$ ).

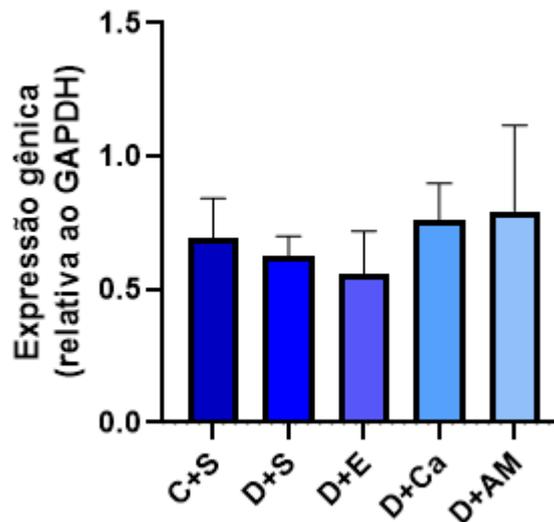


**Figura 20 - Expressão gênica de FKBP5 no NAc de machos fase II.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de FKBP5 no NAc de machos (fase II). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e D  $\rightarrow$  Descendentes. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

#### 5.17 EFEITOS DA PM + IS E DOS TRATAMENTOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FKBP5 NO NAc DE FÊMEAS DA FASE II

Os efeitos dos protocolos de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de FKBP5 em fêmeas (fase II) estão ilustrados na Figura 21. Na análise dos resultados do PCR a ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre os grupos sem estresse e os grupos que passaram por PM e IS, assim como os grupos com tratamento ( $F = 0,2019$ ;  $p = 0,9325$ ).

## FKBP5 - Fêmeas - Fase II



**Figura 21 - Expressão gênica de FKBP5 no NAc de fêmeas fase II.** Efeitos do estresse de PM e IS e dos tratamentos com *C. asiatica* (30 mg/kg), ácido madecássico (10 mg/kg) escitalopram (10 mg/kg) sobre a expressão gênica de FKBP5 no NAc de fêmeas (fase II). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Grupos: C  $\rightarrow$  Controle; e D  $\rightarrow$  Descendentes. Tratamentos: Ca  $\rightarrow$  *Centella asiatica*; E  $\rightarrow$  Escitalopram; e AM  $\rightarrow$  Ácido Madecássico.

## DISCUSSÃO

Esta pesquisa investigou os efeitos dos protocolos de PM nos primeiros dez dias de vida associada ao IS na vida adulta jovem, nos comportamentos tipo depressivos e na expressão gênica de NR3C1 e FKBP5 em ratos Wistar, tanto machos quanto fêmeas, e em descendentes de fêmeas que passaram pelos protocolos de estresse antes da prenhez. O estresse induzido pelos protocolos de PM + IS aumentou o tempo de imobilidade tanto em machos quanto em fêmeas no teste de nado forçado e reduziu, na fase I, a expressão gênica de NR3C1 e FKBP5 no grupo estresse em relação ao grupo controle. Os grupos submetidos aos tratamentos com *C. asiatica*, ácido madecássico e escitalopram reduziram significativamente os comportamentos tipo depressivos e modularam a expressão gênica de FKBP5 e NR3C1.

Os resultados da fase I indicaram que o estresse a partir de PM + IS aumentou significativamente o tempo de imobilidade em machos e fêmeas, sugerindo que esses protocolos de estresse culminam em comportamento tipo depressivo, comumente avaliado no teste de natação forçada. O aumento do tempo de imobilidade pode ser interpretado como

uma resposta de desespero comportamental, refletindo a vulnerabilidade ao estresse (Rosas-Sánchez, German-Ponciano e Rodríguez-Landa, 2022; Yankelevitch-Yahav *et al.*, 2015). Esses achados estão alinhados com a literatura, que sugere que o estresse pode comprometer a capacidade de adaptação do organismo, exacerbando comportamentos tipo depressivos em animais (Li *et al.*, 2023; Mingardi *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2020) e comportamento depressivo em humanos (Burrowes *et al.*, 2022; De Manincor *et al.*, 2016; Ogata *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2017).

Os tratamentos com *C. asiatica*, ácido madecássico e escitalopram mostraram eficácia na redução dos efeitos negativos da PM + IS nos machos e fêmeas da fase I. Os resultados reforçam a sugestão da literatura de que a *C. asiatica* e o ácido madecássico podem atuar como agentes antidepressivos, possivelmente modulando vias neuroquímicas associadas ao estresse (Mando *et al.*, 2024; Micheli *et al.*, 2022; Zakaria *et al.*, 2023). Estes resultados corroboram com um estudo anterior realizado em ratos Wistar submetidos a estresse crônico e tratados com *C. asiatica* e ácido madecássico (Bertollo, Mingoti, *et al.*, 2024), e outros diversos estudos em diferentes modelos animais (Holvoet *et al.*, 2023; Mando *et al.*, 2024; Micheli *et al.*, 2022; Zakaria *et al.*, 2023).

Estudos com modelos de depressão em zebrafish (Mando *et al.*, 2024; Zakaria *et al.*, 2023) e camundongos, e estudos *in vitro* (Micheli *et al.*, 2022) apontam que a *C. asiatica* e seus compostos induzem melhora de comportamentos tipo depressivos e alterações bioquímicas causadas por estresse, especialmente a neuroinflamação. Além disso, um estudo com *Drosophila melanogaster* demonstrou que um extrato aquoso de *C. asiatica* melhora sintomas associados à depressão, como anedonia e redução da atividade física. Os autores descrevem que os efeitos benéficos foram atribuídos principalmente à ação sinérgica dos ácidos mono-cafeoilquínicos presentes na planta, em especial o ácido clorogênico (Holvoet *et al.*, 2023).

Derivados da mesma classe dos ácidos mono-cafeoilquínicos, como o ácido chicórico e o rutinosídeo de ácido cafeico, foram identificados no extrato hidroalcoólico de *C. asiatica* utilizado neste estudo. Essas moléculas, além de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, têm papel relevante na modulação de vias biológicas relacionadas ao estresse oxidativo e à inflamação, reforçando sua eficácia no contexto de proteção e regeneração celular (Engels *et al.*, 2012; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2011; Zanatta *et al.*, 2021).

Em uma pesquisa utilizando zebrafish exposto ao estresse induzido por reserpina, o extrato etanólico de *C. asiatica* modulou os níveis de biomarcadores relacionados ao estresse.

No estudo foi observado um aumento nos níveis de  $\beta$ -hidroxiisovalérico, leucina, treonina, esciloinositol, lactato, betaína, valina, colina e L-fucose no grupo tratado com *C. asiatica*, em comparação com os animais estressados não tratados. Além disso, o extrato induziu um aumento significativo na biossíntese de valina, leucina e isoleucina, como evidenciado pelas alterações metabólicas detectadas no cérebro dos peixes. Esses efeitos bioquímicos foram acompanhados pela reversão de comportamentos tipo depressivos, demonstrada pelo aumento na distância total percorrida e redução na duração do comportamento de congelamento nos testes de campo aberto (Zakaria *et al.*, 2023).

No contexto da neuroproteção, análises em modelos animais revelam que o extrato de *C. asiatica* desempenha um papel importante na cognição, função cerebral, adaptação e resiliência a mudanças relacionadas à idade. Camundongos machos e fêmeas C57BL6 envelhecidos que receberam tratamento com o extrato da planta na água por 5 semanas (1000 mg/kg/dia) apresentaram melhorias no aprendizado, função executiva e memória de reconhecimento, além de uma redução da ansiedade nas fêmeas (Gray *et al.*, 2024). Além disso, análises em *Caenorhabditis elegans* mostraram que a *C. asiatica* melhorou a função cerebral, aumentou a memória e demonstrou efeitos neuroprotetores nesses organismos (Naß, Kampf e Efferth, 2021).

Na fase II, os efeitos intergeracionais da PM e IS nas mães foram particularmente intrigantes. Os descendentes de mães estressadas apresentaram aumento no tempo de imobilidade, sugerindo que a exposição ao estresse durante a prenhez pode predispor os filhotes a um comportamento semelhante ao de desespero. Os tratamentos com *C. asiatica* em machos, e os tratamentos com *C. asiatica* e ácido madecássico em fêmeas reduziram significativamente os efeitos do estresse materno antes da prenhez.

A exposição ao estresse durante a prenhez tem sido associada a alterações comportamentais significativas nos descendentes. Estudos indicam que o estresse materno pode predispor os filhotes a comportamentos depressivos, como evidenciado pelo aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado em modelos animais. A imobilidade aumentada sugere um comportamento semelhante ao desespero, reforçando a teoria de que a experiência materna de estresse pode influenciar o comportamento da prole, possivelmente através de mecanismos epigenéticos que alteram a expressão gênica (Schmidt *et al.*, 2018).

O estresse antes da gestação não apenas impacta o comportamento imediato dos filhotes, mas também pode ter efeitos duradouros que se estendem por gerações. Essas alterações podem ser mediadas por mudanças neurobiológicas, incluindo a regulação de

neurotransmissores e o aumento da neuroinflamação (Coussons-Read, 2013). Nesse contexto, intervenções com extratos de plantas têm mostrado promissora eficácia na mitigação dos efeitos do estresse materno, como é o caso da *C. asiatica*, que reverteu os efeitos do estresse antes da prenhez nos descendentes, tanto machos quanto fêmeas.

Outro teste comportamental realizado foi o teste de campo aberto, utilizado para avaliar efeitos locomotores (Baretta *et al.*, 2012). Neste estudo não foram observadas diferenças significativas na atividade locomotora entre os grupos, tanto em machos quanto em fêmeas da fase I e da fase II. A ausência de diferenças nos parâmetros de cruzamentos e levantamentos sugere que nem o estresse induzido por PM e IS, nem os tratamentos com escitalopram, *C. asiatica* e ácido madecássico influenciaram a atividade locomotora dos animais. Assim, é possível inferir que os parâmetros de imobilidade e mobilidade na natação forçada não tiveram influência locomotora do estresse ou dos tratamentos.

Alterações na expressão gênica de NR3C1 e FKBP5, cujas proteínas estão envolvidas na função do eixo HHA, podem ter implicações significativas, influenciando a resposta ao estresse e a vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos. O gene NR3C1 codifica o GR, que modula a resposta ao cortisol (Wadji *et al.*, 2023), enquanto o FKBP5 é um regulador negativo do receptor de glicocorticoides (Zhang *et al.*, 2022), afetando sua disponibilidade e ação. Os níveis elevados de estresse, principalmente o estresse crônico, podem causar disfunções neste eixo, levando à modulação anormal de genes como NR3C1 e FKBP5, resultando em uma expressão alterada (Malekpour *et al.*, 2023). Nesta pesquisa foram observadas diferenças comportamentais significativas entre machos e fêmeas em relação ao estresse e aos tratamentos aplicados, e esses efeitos comportamentais podem estar relacionados com a expressão diferencial destes genes no NAc.

A expressão gênica de NR3C1 no NAc foi afetada significativamente pela PM + IS, com reduções observadas nos grupos estressados machos e fêmeas da fase I. A diminuição na expressão de NR3C1 pode reduzir a função dos glicocorticóides no NAc.

O NAc desempenha um papel central na modulação da motivação, no sistema de recompensa e na resposta ao estresse. Ele recebe projeções de regiões cerebrais como o córtex pré-frontal e o hipocampo, que integram informações emocionais e comportamentais. A exposição a estressores altera significativamente a expressão gênica no NAc, modulando sua função e contribuindo para mudanças comportamentais. O estresse também influencia diretamente os sistemas de receptores opioides no NAc, particularmente os receptores

$\mu$ -opioide (MOR) e  $\kappa$ -opioide (KOR), que regulam comportamentos de recompensa e busca por substâncias (Askari, Mousavi e Vaez-Mahdavi, 2022).

A desregulação desses sistemas no NAc está associada a maior vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos, como dependência e depressão. Além disso, a redução na expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no NAc é outro mecanismo importante relacionado ao estresse crônico, influenciando a plasticidade neuronal e a função dopaminérgica, ambas necessárias para o comportamento motivacional e de recompensa. Modelos experimentais de PM demonstram que o estresse no início da vida pode causar alterações neurobiológicas duradouras no NAc. Essas mudanças incluem a redução da expressão do BDNF e a hiperatividade do eixo HHA, contribuindo para maior preferência por substâncias como álcool e opioides em paradigmas experimentais (Askari, Mousavi e Vaez-Mahdavi, 2022).

Quando há redução na expressão gênica, a expressão proteica consequentemente reduz. Portanto, a redução de NR3C1 está associada com a redução do GR (Karin *et al.*, 2020). Estudos anteriores corroboram que em cérebros *post-mortem* de humanos com TDM houve redução na expressão do GR, especialmente no hipocampo (López *et al.*, 1998), e uma diminuição do miRNA de GR no córtex frontal, córtex temporal inferior, córtex entorrinal, hipocampo e subículo (Webster *et al.*, 2002). Além disso, a expressão de proteína e mRNA de GR foi significativamente diminuída no córtex pré-frontal e na amígdala de adolescentes vítimas de suicídio (Pandey *et al.*, 2013). A redução do GR também foi identificada em modelos animais de depressão (López *et al.*, 1998) e em tecidos periféricos de indivíduos com TDM analisados *in vitro* (Pariante, 2004). Essa queda na expressão do GR está associada à diminuição da expressão do gene NR3C1 (Palma-Gudiel *et al.*, 2015; Pandey *et al.*, 2013), um achado também observado nesta pesquisa.

É importante citar que a supressão da expressão do gene NR3C1 também reduz em outros transtornos, como em pacientes com transtorno do estresse pós-traumático (González Ramírez *et al.*, 2020). Além disso, os protocolos realizados nesta pesquisa foram de PM e IS, mimetizando estresse no início da vida e falta de suporte social na vida adulta. Nesse contexto, um estudo que investigou a metilação do promotor do exon 1F do NR3C1 em indivíduos que sofreram maus-tratos na infância encontrou uma associação entre o aumento da metilação e a gravidade dos maus-tratos. A metilação do promotor afeta a expressão gênica de NR3C1, e portanto interfere no eixo HHA (Perroud *et al.*, 2011).

A inflamação presente no TDM pode não ser apenas um resultado da resistência aos glicocorticóides e da sinalização reduzida do GR, mas também da ação pró-inflamatória do próprio cortisol. Em condições normais, o cortisol exerce efeitos anti-inflamatórios, mas em casos de hiperatividade do eixo HHA, seus níveis aumentam de forma anômala, promovendo inflamação (Amasi-Hartoonian *et al.*, 2022). Essa desregulação, por sua vez, pode levar à redução da expressão dos genes-alvo dos GRs em indivíduos com TDM e em modelos animais, agravando a dificuldade do organismo em modular adequadamente a resposta ao estresse (Amasi-Hartoonian *et al.*, 2022).

A diminuição da expressão gênica de FKBP5 no NAc dos grupos estressados também se alinha com achados que mostram que o estresse crônico afeta os reguladores moleculares do receptor de glicocorticoide. FKBP51, que atua como um regulador negativo da função do receptor de glicocorticoide, é influenciado pelo ambiente estressante de maneira a modular a sensibilidade dos tecidos ao cortisol. Estudos sugerem que a diminuição de FKBP5 pode estar ligada a alterações no controle da retroalimentação do eixo HHA, levando a um aumento na exposição prolongada a glicocorticóides (Binder, 2009).

Esses mecanismos são frequentemente implicados em transtornos depressivos, onde o eixo HHA é disfuncional e onde há uma dessensibilização ou redução dos receptores de glicocorticoide, resultando em uma menor capacidade de regular o estresse de forma eficaz (Menke *et al.*, 2013; Wüst *et al.*, 2005). Dessa forma, a redução de NR3C1 e FKBP5 observada nos grupos estressados pode ser um reflexo direto dessas respostas adaptativas e disfuncionais ao estresse crônico.

Nesse caso, a redução do GR indicaria menor sensibilidade ao cortisol (Karin *et al.*, 2020), enquanto a redução de FKBP51 poderia sinalizar um mecanismo compensatório, já que FKBP51 normalmente atua inibindo a ativação do GR (Brix *et al.*, 2022). Em um estudo realizado com roedores, os autores identificaram resultados que corroboram com a hipótese de que a redução na expressão gênica seja um mecanismo compensatório. Níveis mais baixos de GR no NAc foram observados em ratos com alta ansiedade e propensão à submissão, enquanto animais com baixa ansiedade e maior propensão à dominância apresentaram níveis mais elevados de GR nessa região cerebral. Além disso, a redução experimental na expressão de GR no NAc, induzida por métodos virais, aumentou a probabilidade de os animais exibirem comportamento dominante. Esses achados indicam que níveis reduzidos de GR no NAc estão associados a maior dominância social, sugerindo que o receptor de glicocorticóides

nessa região desempenha um papel crucial na regulação da hierarquia social (Papilloud *et al.*, 2019).

A FKBP51 reduz a eficiência dos glicocorticóides por diminuir a expressão de proopiomelanocortina. Isso significa que o FKBP51 atrapalha a capacidade do corpo de regular a produção de cortisol, mantendo o eixo HHA mais ativo do que deveria. Ao reduzir a expressão de FKBP51, a sensibilidade dos GRs melhora, facilitando o feedback negativo e ajudando a regular a produção de cortisol. Esse ajuste é especialmente benéfico em situações de envelhecimento ou estresse crônico, prevenindo disfunções metabólicas e emocionais associadas ao excesso de cortisol (Brix *et al.*, 2022).

Um estudo com camundongos identificou que a deleção de FKBP5 reduziu as respostas imunes centrais induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) no hipocampo, incluindo a ativação microglial e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, observadas nos camundongos WT (do inglês: tipo selvagem). Essa atenuação foi acompanhada por uma diminuição na ativação do GR no hipocampo dos camundongos FKBP5-KO. Em WT, a injeção de LPS induziu um aumento tardio na expressão de NR3C1, em seu alvo transcricional SGK1 e nos níveis proteicos de GR no hipocampo no sétimo dia pós-injeção (LPS-D7), efeitos que foram significativamente reduzidos nos camundongos FKBP5-KO. Além disso, imagens imunofluorescentes indicaram maior localização nuclear de GR nos neurônios CA1 dorsal e ventral em WT, sugerindo maior ativação do eixo HHA. Esta resposta foi enfraquecida nos FKBP5-KO, que também apresentaram maior variação individual na ativação nuclear de GR. Considerando a conexão funcional entre o hipocampo e o NAc, é plausível que a redução de FKBP51 também possa modular respostas inflamatórias e a ativação de GR no NAc, promovendo resiliência a estímulos inflamatórios e estressores, com implicações para o comportamento motivacional e emocional (Gan *et al.*, 2022).

A redução da expressão gênica e proteica de GR e FKBP51 no NAc sob condições de estresse crônico pode contribuir para a disfunção dos circuitos neurais relacionados à regulação emocional e ao processamento de recompensas. Alterações na atividade do eixo HHA e a sinalização de glicocorticóides estão associadas a alterações estruturais e funcionais nessa área cerebral, impactando negativamente a neuroplasticidade e a conectividade sináptica (Freimer *et al.*, 2022). Assim, corrobora com a hipótese de que a diminuição da expressão de GR e FKBP51 pode ser uma resposta adaptativa a condições de estresse prolongado, tentando mitigar os efeitos deletérios do estresse nos processos neurais (Zhang *et al.*, 2022).

O tratamento com ácido madecássico na fase I foi eficaz em reverter de forma significativa essa redução da expressão gênica de NR3C1 (em machos) e FKBP5 (em machos e fêmeas), o que pode ser interpretado como uma normalização do eixo HHA e uma recuperação da capacidade do organismo de lidar com o estresse. A modulação da expressão gênica pelo ácido madecássico pode estar relacionada às suas propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras, destacando sua potencial utilidade terapêutica (Bertollo, Mingoti, *et al.*, 2024).

Em relação a fase II, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à expressão gênica de NR3C1 e FKBP5 no NAc, sugerindo que os comportamentos tipo depressivos identificados nestes animais são decorrentes de outras alterações bioquímicas.

No contexto desta pesquisa, as alterações comportamentais observadas na fase II, especialmente nos descendentes de mães que sofreram estresse, podem ter sido mediadas por mecanismos epigenéticos. O estresse materno anterior a prenhez pode ter induzido modificações epigenéticas que afetaram a expressão gênica nos filhotes, predispondo-os a comportamentos tipo depressivos (Mychasiuk *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2018). Apesar de não terem sido identificadas alterações na expressão gênica de NR3C1 e FKBP5 no NAc dos descendentes, é possível que outros genes podem ter sido afetados epigeneticamente pelo estresse das fêmeas antes da prenhez. Além disso, outros fatores também podem ter mediado os comportamentos tipo depressivos identificados nos descendentes de mães estressadas, como por exemplo a neuroinflamação e o estresse oxidativo (Grolli *et al.*, 2023b), já identificados como contribuintes para a fisiopatologia do TDM e modulados positivamente pelos tratamentos com *C. asiatica* e ácido madecássico (Bertollo, Mingoti, *et al.*, 2024).

Esta pesquisa possui algumas limitações que devem ser consideradas. Primeiro, a amostra pode não representar toda a diversidade genética presente na população. Além disso, a avaliação da expressão gênica se concentrou apenas em NR3C1 e FKBP5 do NAc. Outros genes e vias relevantes para a resposta ao estresse e ao TDM poderiam ser investigados para proporcionar uma compreensão mais abrangente de possíveis alterações epigenéticas, assim como outras regiões cerebrais, possivelmente envolvidas. A falta de diferenças significativas na expressão gênica entre os grupos da fase II levanta questões sobre os mecanismos subjacentes às alterações comportamentais observadas. Embora a epigenética seja um fator importante, outros aspectos, como a interação entre genes e ambiente e a influência de mediadores neuroquímicos, também devem ser explorados em pesquisas futuras.

Futuras investigações poderiam se beneficiar da inclusão de um número maior de genes e do uso de técnicas epigenéticas para medir a metilação do DNA e modificações de histonas. Estudos longitudinais que examinem a relação entre estresse materno, alterações epigenéticas e comportamentos em descendentes também podem contribuir para o entendimento de como as experiências maternas impactam a prole. Além disso, a exploração de intervenções precoces, como tratamentos com *C. asiatica* e ácido madecássico, poderia fornecer informações relevantes sobre possíveis efeitos protetores contra o estresse materno e promover uma resiliência maior em descendentes.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os protocolos de PM e IS induziram comportamentos tipo depressivos em machos e fêmeas (fase I) e em descendentes de mães estressadas antes da prenhez (fase II). Nos animais da fase I, as alterações comportamentais estiveram relacionadas com a redução na expressão gênica de NR3C1 e FKBP5 no NAc, sugerindo que o estresse precoce e a falta de suporte social influenciam a expressão gênica de moléculas relacionadas ao eixo HHA.

Os tratamentos com extrato da *C. asiatica* e seu composto ativo, ácido madecássico, bem como o antidepressivo escitalopram, demonstraram eficácia em reduzir significativamente os comportamentos tipo depressivos, além de modular a expressão de NR3C1 e FKBP5 no NAc. Esses achados sugerem que a modulação da expressão gênica dessas moléculas pode ser um mecanismo crucial associado ao efeito antidepressivo desses tratamentos, especialmente em resposta ao estresse.

Além disso, na fase II do estudo, a indução de comportamentos tipo depressivos nos descendentes devido ao estresse materno antes da prenhez reforça a ideia de que o estresse pode ter efeitos biológicos intergeracionais. A capacidade dos tratamentos de modular esses efeitos destaca seu potencial terapêutico.

Por fim, esses resultados ressaltam a importância de considerar as diferenças sexuais nas respostas ao estresse e ao tratamento, contribuindo para o desenvolvimento de intervenções mais eficazes e personalizadas.



## REFERÊNCIAS

- Ministério da Saúde. **A Fitoterapia No Sus E O Programa De Pesquisa De Plantas Medicinais Da Central De Medicamentos**. 2006.
- AMASI-HARTOONIAN, N. *et al.* Cause or consequence? Understanding the role of cortisol in the increased inflammation observed in depression. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 24, p. 100356, jun. 2022.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. DSM-5-TR ed. [s.l.] American Psychiatric Association Publishing, 2022.
- ASKARI, N.; MOUSAVI, A.; VAEZ-MAHDAVI, M. R. Maternal deprivation effect on morphine-induced CPP is related to changes in opioid receptors in selected rat brain regions (hippocampus, prefrontal cortex, and nucleus accumbens). **Behavioural Processes**, v. 197, p. 104607, abr. 2022.
- ATTIA, Y. M. *et al.* Verbascoside: Identification, Quantification, and Potential Sensitization of Colorectal Cancer Cells to 5-FU by Targeting PI3K/AKT Pathway. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16939, 16 nov. 2018.
- BAKUSIC, J. *et al.* Stress, burnout and depression: A systematic review on DNA methylation mechanisms. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 92, p. 34–44, jan. 2017.
- BARBER, R. D. *et al.* GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiological Genomics**, v. 21, n. 3, p. 389–395, 11 maio 2005.
- BARETTA, I. P. *et al.* Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 46–54, mar. 2012.
- BERTOLLO, A. G. *et al.* Impact of COVID-19 on anxiety and depression - biopsychosocial factors. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 22, 10 fev. 2023.
- BERTOLLO, A. G.; GALVAN, A. C. L.; *et al.* Early Life Stress and Major Depressive Disorder—An Update on Molecular Mechanisms and Synaptic Impairments. **Molecular Neurobiology**, 3 fev. 2024.
- BERTOLLO, A. G.; MINGOTI, M. E. D.; *et al.* Hydroalcoholic Extract of *Centella asiatica* and Madecassic Acid Reverse Depressive-Like Behaviors, Inflammation and Oxidative Stress in Adult Rats Submitted to Stress in Early Life. **Molecular Neurobiology**, 4 maio 2024.
- BINDER, E. B. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v.

34, p. S186–S195, dez. 2009.

BLIER, P.; EL MANSARI, M. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression.

**Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1615, p. 20120536, 5 abr. 2013.

BOBADE, V. *et al.* Prophylactic effects of asiaticoside-based standardized extract of *Centella asiatica* (L.) Urban leaves on experimental migraine: Involvement of 5HT1A/1B receptors.

**Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 4, p. 274–282, abr. 2015.

BOONDAM, Y. *et al.* Inverted U-shaped response of a standardized extract of *Centella asiatica* (ECa 233) on memory enhancement. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8404, 10 jun. 2019.

BRIX, L. M. *et al.* The co-chaperone FKBP51 modulates HPA axis activity and age-related maladaptation of the stress system in pituitary proopiomelanocortin cells.

**Psychoneuroendocrinology**, v. 138, p. 105670, abr. 2022.

BURROWES, S. A. B. *et al.* Enhanced mindfulness-based stress reduction in episodic migraine—effects on sleep quality, anxiety, stress, and depression: a secondary analysis of a randomized clinical trial. **Pain**, v. 163, n. 3, p. 436–444, mar. 2022.

CATENA-DELL’OSSO, M. *et al.* Inflammation, serotonin and major depression. **Current Drug Targets**, v. 14, n. 5, p. 571–577, 1 maio 2013.

CHAN, J. C. *et al.* Reproductive tract extracellular vesicles are sufficient to transmit intergenerational stress and program neurodevelopment. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1499, 20 mar. 2020.

CHAVEZ-BLANCO, A. *et al.* Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study. **Molecular Cancer**, v. 4, n. 1, p. 22, dez. 2005.

CHEN, R.-W. *et al.* Involvement of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and p53 in Neuronal Apoptosis: Evidence That GAPDH Is Upregulated by p53. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 21, p. 9654–9662, 1 nov. 1999.

CHEN, Y. *et al.* [Effect of total triterpenes from *Centella asiatica* on the depression behavior and concentration of amino acid in forced swimming mice]. **Zhong Yao Cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 26, n. 12, p. 870–873, dez. 2003.

\_\_\_\_\_. [Effects of total triterpenes of *Centella asiatica* on the corticosterone levels in serum and contents of monoamine in depression rat brain]. **Zhong Yao Cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 28, n. 6, p. 492–496, jun. 2005.

- CHMIELEWSKA, N. *et al.* Epigenetic mechanisms of stress and depression. **Psychiatria Polska**, v. 53, n. 6, p. 1413–1428, 31 dez. 2019.
- CLEARE, A. *et al.* Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: A revision of the 2008 British Association for Psychopharmacology guidelines. **Journal of Psychopharmacology**, v. 29, n. 5, p. 459–525, maio 2015.
- COLLINS, F. S. Implications of the Human Genome Project for Medical Science. **JAMA**, v. 285, n. 5, p. 540, 7 fev. 2001.
- COUSSONS-READ, M. E. Effects of prenatal stress on pregnancy and human development: mechanisms and pathways. **Obstetric Medicine**, v. 6, n. 2, p. 52–57, jun. 2013.
- CUI, L. *et al.* Major depressive disorder: hypothesis, mechanism, prevention and treatment. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 30, 9 fev. 2024.
- DAVIES, T. H.; NING, Y.-M.; SÁNCHEZ, E. R. A New First Step in Activation of Steroid Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 4597–4600, fev. 2002.
- 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 Research**, v. 240, p. 421–430, jun. 2016.
- DE MANINCOR, M. *et al.* INDIVIDUALIZED YOGA FOR REDUCING DEPRESSION AND ANXIETY, AND IMPROVING WELL-BEING: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL: Research Article: Yoga for Mental Health. **Depression and Anxiety**, v. 33, n. 9, p. 816–828, set. 2016.
- DE SOUZA, L. M. *et al.* HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 59–67, maio 2008.
- DEVI, G.; BALASUNDARAM, C.; HARIKRISHNAN, R. Effect of madecassic acid on innate-adaptive immune response and cytokine gene expression in *Labeo rohita* against *Argulus siamensis*. **MedDocs eBooks**, 2020.
- DION, A.; MUÑOZ, P. T.; FRANKLIN, T. B. Epigenetic mechanisms impacted by chronic stress across the rodent lifespan. **Neurobiology of Stress**, v. 17, p. 100434, mar. 2022.
- DJORDJEVIC, J. *et al.* Chronic social isolation compromises the activity of both glutathione peroxidase and catalase in hippocampus of male wistar rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 5, p. 693–700, jul. 2010.
- \_\_\_\_\_. Effects of Chronic Social Isolation on Wistar Rat Behavior and Brain Plasticity Markers. **Neuropsychobiology**, v. 66, n. 2, p. 112–119, 2012.

- ECHEVERRIA, P. C.; PICARD, D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 6, p. 641–649, jun. 2010.
- ENGELS, C. *et al.* Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 557–562, maio 2012.
- FALCÃO, S. I. *et al.* Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 309–318, jul. 2013.
- FARAHBAKHS, Z.; RADAHMADI, M. The protective effects of escitalopram on synaptic plasticity in the CA1 region of chronically stressed and non-stressed male rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 82, n. 8, p. 747–757, dez. 2022.
- FELGER, J. C.; LOTRICH, F. E. Inflammatory cytokines in depression: Neurobiological mechanisms and therapeutic implications. **Neuroscience**, v. 246, p. 199–229, ago. 2013.
- FIROUZABADI, N. *et al.* Effect of escitalopram on an acetic acid-induced ulcerative colitis model. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 48, n. 5, p. 782–790, maio 2021.
- FITZGERALD, K. T.; BRONSTEIN, A. C. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Exposure. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 28, n. 1, p. 13–17, fev. 2013.
- FOX, M. E.; LOBO, M. K. The molecular and cellular mechanisms of depression: a focus on reward circuitry. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 12, p. 1798–1815, dez. 2019.
- FREIMER, D. *et al.* The gut microbiota, HPA axis, and brain in adolescent-onset depression: Probiotics as a novel treatment. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 26, p. 100541, dez. 2022.
- FUJII, T. *et al.* Effect of the common functional FKBP5 variant (rs1360780) on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and peripheral blood gene expression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 42, p. 89–97, abr. 2014.
- GAN, Y.-L. *et al.* FKBP51 mediates resilience to inflammation-induced anxiety through regulation of glutamic acid decarboxylase 65 expression in mouse hippocampus. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 152, dez. 2022.
- GAPP, K. *et al.* Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 5, p. 667–669, maio 2014.
- GLEASON, G. *et al.* The serotonin <sub>1A</sub> receptor gene as a genetic and prenatal maternal

- environmental factor in anxiety. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 16, p. 7592–7597, 20 abr. 2010.
- GONZÁLEZ RAMÍREZ, C. *et al.* The NR3C1 gene expression is a potential surrogate biomarker for risk and diagnosis of posttraumatic stress disorder. **Psychiatry Research**, v. 284, p. 112797, fev. 2020.
- GOODWIN, G. M. *et al.* Single-Dose Psilocybin for a Treatment-Resistant Episode of Major Depression. **New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 18, p. 1637–1648, 3 nov. 2022.
- GRAY, N. E. *et al.* Amelioration of age-related cognitive decline and anxiety in mice by *Centella asiatica* extract varies by sex, dose and mode of administration. **Frontiers in Aging**, v. 5, p. 1357922, 6 maio 2024.
- GREEN, J. G. *et al.* Childhood Adversities and Adult Psychiatric Disorders in the National Comorbidity Survey Replication I: Associations With First Onset of *DSM-IV* Disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 113, 1 fev. 2010.
- GROLI, R. E. *et al.* Quetiapine effect on depressive-like behaviors, oxidative balance, and inflammation in serum of rats submitted to chronic stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 396, n. 7, p. 1423–1433, jul. 2023a.
- \_\_\_\_\_. Quetiapine effect on depressive-like behaviors, oxidative balance, and inflammation in serum of rats submitted to chronic stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 396, n. 7, p. 1423–1433, jul. 2023b.
- GUIDOTTI, G. *et al.* Glucocorticoid Receptor and FKBP5 Expression Is Altered Following Exposure to Chronic Stress: Modulation by Antidepressant Treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 4, p. 616–627, mar. 2013.
- HAN, Y. *et al.* Minocycline inhibits microglial activation and alleviates depressive-like behaviors in male adolescent mice subjected to maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 107, p. 37–45, set. 2019.
- HARTMANN, J. *et al.* The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 332–339, jan. 2012.
- HEARD, E.; MARTIENSSEN, R. A. Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 95–109, mar. 2014.
- HOLSBOER, F. The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 477–501, nov. 2000.
- HOLVOET, H. *et al.* Chlorogenic Acids, Acting via Calcineurin, Are the Main Compounds in

- Centella asiatica Extracts That Mediate Resilience to Chronic Stress in *Drosophila melanogaster*. **Nutrients**, v. 15, n. 18, p. 4016, 16 set. 2023.
- IGNÁCIO, Z. M. *et al.* Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: Insights in depression. **Neuroscience**, v. 275, p. 455–468, set. 2014.
- IGNÁCIO, Z. M. *et al.* Maternal Deprivation. *Em: Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. [s.l.] Elsevier, 2017. .
- IGNÁCIO, Z. M. *et al.* Quetiapine treatment reverses depressive-like behavior and reduces DNA methyltransferase activity induced by maternal deprivation. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 225–232, mar. 2017.
- \_\_\_\_\_. Physical Exercise and Neuroinflammation in Major Depressive Disorder. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 12, p. 8323–8335, dez. 2019.
- JABLONKA, E.; LAMB, M. J. **Evolution in four dimensions: genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life**. Cambridge (Mass.): The MIT Press, 2005.
- JAMES, J.; DUBERY, I. Identification and quantification of triterpenoid centelloids in *Centella asiatica* (L.) Urban by densitometric TLC. **Journal of Planar Chromatography – Modern TLC**, v. 24, n. 1, p. 82–87, fev. 2011.
- JANA, U. *et al.* A clinical study on the management of generalized anxiety disorder with *Centella asiatica*. **Nepal Medical College journal: NMCJ**, v. 12, n. 1, p. 8–11, mar. 2010.
- JIANG, S. *et al.* Epigenetic Modifications in Stress Response Genes Associated With Childhood Trauma. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, p. 808, 8 nov. 2019.
- JOHNSON, W. *et al.* Safety Assessment of *Centella asiatica* -Derived Ingredients as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 42, n. 1\_suppl, p. 5S-22S, jun. 2023.
- KANG, H.-J. *et al.* Methylation of the glucocorticoid receptor gene associated with depression in patients with acute coronary syndrome. **Psychoneuroendocrinology**, v. 101, p. 42–49, mar. 2019.
- KARIN, O. *et al.* A new model for the HPA axis explains dysregulation of stress hormones on the timescale of weeks. **Molecular Systems Biology**, v. 16, n. 7, p. e9510, jul. 2020.
- KOENIG, A. M. *et al.* Intergenerational gene × environment interaction of FKBP5 and childhood maltreatment on hair steroids. **Psychoneuroendocrinology**, v. 92, p. 103–112, jun. 2018.
- LARSEN, M. H. *et al.* Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic

- unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 13, p. 808–816, out. 2010.
- LI, X. *et al.* AKT and MAPK signaling pathways in hippocampus reveals the pathogenesis of depression in four stress-induced models. **Translational Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 200, 12 jun. 2023.
- LI, Y. *et al.* Neurotransmitter and Related Metabolic Profiling in the Nucleus Accumbens of Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Anhedonia-Like Rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 16, p. 862683, 29 abr. 2022.
- LIN, P.-Y.; HUANG, Y.-C.; HUNG, C.-F. Shortened telomere length in patients with depression: A meta-analytic study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 76, p. 84–93, maio 2016.
- LOKANATHAN, Y. *et al.* Recent Updates in Neuroprotective and Neuroregenerative Potential of *Centella asiatica*. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, v. 23, n. 1, p. 4–14, jan. 2016.
- LÓPEZ, J. F. *et al.* Regulation of Serotonin1A, Glucocorticoid, and Mineralocorticoid Receptor in Rat and Human Hippocampus: Implications for the Neurobiology of Depression. **Biological Psychiatry**, v. 43, n. 8, p. 547–573, abr. 1998.
- MALEKPOUR, M. *et al.* Role of FKBP5 and its genetic mutations in stress-induced psychiatric disorders: an opportunity for drug discovery. **Frontiers in Psychiatry**, v. 14, p. 1182345, 16 jun. 2023.
- MANDO, Z. *et al.* Biomarker triterpenoids of *Centella asiatica* as potential antidepressant agents: Combining in vivo and in silico studies. **Behavioural Brain Research**, v. 466, p. 114976, maio 2024.
- MARTINS DE CARVALHO, L.; CHEN, W.-Y.; LASEK, A. W. Epigenetic mechanisms underlying stress-induced depression. **International Review of Neurobiology**, v. 156, p. 87–126, 2021.
- MAVRIDIS, I. [The role of the nucleus accumbens in psychiatric disorders]. **Psychiatrike = Psychiatriki**, v. 25, n. 4, p. 282–294, 2015.
- MAYER, S. E. *et al.* The roles of comorbidity and trauma exposure and its timing in shaping HPA axis patterns in depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 120, p. 104776, out. 2020.
- MCGHEE, K. E.; BELL, A. M. Paternal care in a fish: epigenetics and fitness enhancing effects on offspring anxiety. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1794, p. 20141146, 7 nov. 2014.

- MENKE, A. *et al.* Genetic variation in FKBP5 associated with the extent of stress hormone dysregulation in major depression. **Genes, Brain and Behavior**, v. 12, n. 3, p. 289–296, abr. 2013.
- MERKULOV, V. M.; MERKULOVA, T. I.; BONDAR, N. P. Mechanisms of brain glucocorticoid resistance in stress-induced psychopathologies. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 3, p. 351–365, mar. 2017.
- MICHELI, L. *et al.* Efficacy of a vegetal mixture composed of *Zingiber officinale*, *Echinacea purpurea*, and *Centella asiatica* in a mouse model of neuroinflammation: In vivo and ex vivo analysis. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 887378, 30 ago. 2022.
- MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 22–34, jan. 2016.
- MINGARDI, J. *et al.* Functional and Molecular Changes in the Prefrontal Cortex of the Chronic Mild Stress Rat Model of Depression and Modulation by Acute Ketamine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 10814, 28 jun. 2023.
- MINGOTI, M. E. D. *et al.* Stress and Kynurenine-Inflammation Pathway in Major Depressive Disorder. *Em*: KIM, Y.-K. (Ed.). . **Neuroinflammation, Gut-Brain Axis and Immunity in Neuropsychiatric Disorders**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. v. 1411p. 163–190.
- MITCHELL, E. *et al.* Behavioural traits propagate across generations via segregated iterative-somatic and gametic epigenetic mechanisms. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11492, 13 maio 2016.
- MOSER, D. *et al.* The glucocorticoid receptor gene exon 1-F promoter is not methylated at the NGFI-A binding site in human hippocampus. **The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry**, v. 8, n. 4, p. 262–268, 2007.
- MYCHASIUK, R. *et al.* Paternal stress prior to conception alters DNA methylation and behaviour of developing rat offspring. **Neuroscience**, v. 241, p. 100–105, jun. 2013.
- NASIR, M. *et al.* Acute effects of triterpene compounds on locomotor performance and Morris water maze tasks in Sprague-Dawley rats. **Biomedical Research**, v. 16, n. 2, 2015.
- NASS, J.; KAMPF, C. J.; EFFERTH, T. Increased Stress Resistance and Lifespan in *Caenorhabditis elegans* Wildtype and Knockout Mutants—Implications for Depression Treatment by Medicinal Herbs. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1827, 24 mar. 2021.

- NIKBAKHTZADEH, M. *et al.* Cross-talk between the HPA axis and addiction-related regions in stressful situations. **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. e15525, abr. 2023.
- OGATA, H. *et al.* Relationship between circulating mitochondrial DNA and microRNA in patients with major depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 339, p. 538–546, out. 2023.
- PAŁASZ, A. *et al.* Escitalopram affects spexin expression in the rat hypothalamus, hippocampus and striatum. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1326–1331, dez. 2016.
- PALMA-GUDIÉL, H. *et al.* Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 520–535, ago. 2015.
- \_\_\_\_\_. HPA axis regulation and epigenetic programming of immune-related genes in chronically stressed and non-stressed mid-life women. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 92, p. 49–56, fev. 2021.
- PANDEY, G. N. *et al.* Region-specific alterations in glucocorticoid receptor expression in the postmortem brain of teenage suicide victims. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 11, p. 2628–2639, nov. 2013.
- PAPILLOUD, A. *et al.* **The glucocorticoid receptor in the nucleus accumbens plays a crucial role in social rank attainment in rodents**, 13 jun. 2019. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/668897>>. Acesso em: 23 nov. 2024
- PARIANTE, C. M. Glucocorticoid Receptor Function *In Vitro* in Patients with Major Depression. **Stress**, v. 7, n. 4, p. 209–219, dez. 2004.
- PARIANTE, C. M.; MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 5, p. 391–404, mar. 2001.
- PARK, C. *et al.* Stress, epigenetics and depression: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 102, p. 139–152, jul. 2019a.
- \_\_\_\_\_. Stress, epigenetics and depression: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 102, p. 139–152, 1 jul. 2019b.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Seventh edition ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 1986.
- PENG, Z. *et al.* EPA is More Effective than DHA to Improve Depression-Like Behavior, Glia Cell Dysfunction and Hippocampal Apoptosis Signaling in a Chronic Stress-Induced Rat Model of Depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1769, 5 mar. 2020.

- PERROUD, N. *et al.* Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. **Translational Psychiatry**, v. 1, n. 12, p. e59–e59, 13 dez. 2011.
- PORSOLT, R. D. Animal Models of Depression: Utility for Transgenic Research. **Reviews in the Neurosciences**, v. 11, n. 1, jan. 2000.
- PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 21 abr. 1977.
- RÉUS, G. Z. *et al.* Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 451–456, nov. 2013.
- \_\_\_\_\_. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation: Long Antidepressant Effects of Ketamine. **Developmental Neurobiology**, v. 75, n. 11, p. 1268–1281, nov. 2015.
- ROSAS-SÁNCHEZ, G. U.; GERMAN-PONCIANO, L. J.; RODRÍGUEZ-LANDA, J. F. Considerations of Pool Dimensions in the Forced Swim Test in Predicting the Potential Antidepressant Activity of Drugs. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 757348, 7 jan. 2022.
- SABAWOON, A. *et al.* Associations between traumatic event experiences, psychiatric disorders, and suicidal behavior in the general population of Afghanistan: findings from Afghan National Mental Health Survey. **Injury Epidemiology**, v. 9, n. 1, p. 31, 6 out. 2022.
- SCHEUER, S. *et al.* Childhood abuse and depression in adulthood: The mediating role of allostatic load. **Psychoneuroendocrinology**, v. 94, p. 134–142, ago. 2018.
- SCHIELE, M. A. *et al.* Influence of 5-HTT variation, childhood trauma and self-efficacy on anxiety traits: a gene-environment-coping interaction study. **Journal of Neural Transmission**, v. 123, n. 8, p. 895–904, ago. 2016.
- SCHMIDT, M. *et al.* Maternal stress during pregnancy induces depressive-like behavior only in female offspring and correlates to their hippocampal Avp and Oxt receptor expression. **Behavioural Brain Research**, v. 353, p. 1–10, nov. 2018.
- SCORZA, P. *et al.* Stage 2 Registered Report: Epigenetic Intergenerational Transmission: Mothers' Adverse Childhood Experiences and DNA Methylation. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 62, n. 10, p. 1110–1122, out. 2023.
- SEO, M. K. *et al.* Effects of escitalopram and paroxetine on mTORC1 signaling in the rat hippocampus under chronic restraint stress. **BMC Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 39, dez. 2017.

SINHA, R. Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1141, n. 1, p. 105–130, out. 2008.

SOLEK, P. *et al.* Neuronal life or death linked to depression treatment: the interplay between drugs and their stress-related outcomes relate to single or combined drug therapies.

**Apoptosis**, v. 24, n. 9–10, p. 773–784, out. 2019.

STENZ, L. *et al.* Intergenerational Transmission of DNA Methylation Signatures Associated with Early Life Stress. **Current Genomics**, v. 19, n. 8, p. 665–675, 19 out. 2018.

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 10, p. 1552–1562, out. 2000.

SUN, B. *et al.* Therapeutic Potential of Centella asiatica and Its Triterpenes: A Review.

**Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 568032, 4 set. 2020.

SZCZEPANKIEWICZ, A. *et al.* FKBP5 polymorphism is associated with major depression but not with bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 164, p. 33–37, ago. 2014.

SZYF, M. DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis.

**Genome Medicine**, v. 4, n. 3, p. 26, 2012.

TRUJILLO, V.; DURANDO, P. E.; SUÁREZ, M. M. Maternal separation in early life modifies anxious behavior and Fos and glucocorticoid receptor expression in limbic neurons after chronic stress in rats: effects of tianeptine. **Stress**, v. 19, n. 1, p. 91–103, 2 jan. 2016.

TSOUKALAS, D. *et al.* Discovery of potent telomerase activators: Unfolding new therapeutic and anti-aging perspectives. **Molecular Medicine Reports**, 23 ago. 2019.

TUNNARD, C. *et al.* The impact of childhood adversity on suicidality and clinical course in treatment-resistant depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 152–154, p. 122–130, jan. 2014.

TURECKI, G.; MEANEY, M. J. Effects of the Social Environment and Stress on Glucocorticoid Receptor Gene Methylation: A Systematic Review. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 2, p. 87–96, 15 jan. 2016.

VALLVERDÚ-QUERALT, A. *et al.* Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 877–883, dez. 2011.

VAN ZYL, P. J.; DIMATELIS, J. J.; RUSSELL, V. A. Behavioural and biochemical changes in maternally separated Sprague–Dawley rats exposed to restraint stress. **Metabolic Brain Disease**, v. 31, n. 1, p. 121–133, fev. 2016.

- VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1, 18 jun. 2002.
- VARGAS, J. *et al.* Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162665, 9 set. 2016.
- VOINESKOS, D.; DASKALAKIS, Z. J.; BLUMBERGER, D. M. Management of Treatment-Resistant Depression: Challenges and Strategies. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 16, p. 221–234, 2020.
- VOLKOW, N. D.; WANG, G.-J.; BALER, R. D. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15, n. 1, p. 37–46, jan. 2011.
- WADJI, D. L. *et al.* Methylation of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in dyads mother-child exposed to intimate partner violence in Cameroon: Association with anxiety symptoms. **PLOS ONE**, v. 18, n. 4, p. e0273602, 6 abr. 2023.
- WANG, L. *et al.* Asiaticoside produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice, involving reversion of inflammation and the PKA/pCREB/BDNF signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 22, n. 3, p. 2364–2372, 6 jul. 2020.
- WANG, W. *et al.* Genome-wide DNA methylation and gene expression analyses in monozygotic twins identify potential biomarkers of depression. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 416, 2 ago. 2021.
- WANG, X. *et al.* Leukocyte telomere length and depression, anxiety and stress and adjustment disorders in primary health care patients. **BMC Psychiatry**, v. 17, n. 1, p. 148, dez. 2017.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 25 abr. 1953.
- WEAVER, I. C. G. *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847–854, ago. 2004.
- WEBSTER, M. J. *et al.* Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 7, n. 9, p. 985–994, 1 out. 2002.
- WEINHOLD, B. Epigenetics: The Science of Change. **Environmental Health Perspectives**,

v. 114, n. 3, mar. 2006.

WHO. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates (2017)**. Disponível em:

<<https://www.afro.who.int/publications/depression-and-other-common-mental-disorders-global-health-estimates-2017>>. Acesso em: 2 jan. 2024.

\_\_\_\_\_. **COVID-19 pandemic triggers 25% increase in prevalence of anxiety and depression worldwide**. Disponível em:

<<https://www.who.int/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide>>. Acesso em: 23 fev. 2024a.

\_\_\_\_\_. **World mental health report: Transforming mental health for all**. Disponível em:

<<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240049338>>. Acesso em: 2 jan. 2024b.

WILLIAMS, L. M. *et al.* Childhood trauma predicts antidepressant response in adults with major depression: data from the randomized international study to predict optimized treatment for depression. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 5, p. e799–e799, maio 2016.

WÜST, S. *et al.* Habituation of cortisol responses to repeated psychosocial stress—further characterization and impact of genetic factors. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 2, p. 199–211, fev. 2005.

XU, J. *et al.* Short- and long-term alterations of FKBP5-GR and specific microRNAs in the prefrontal cortex and hippocampus of male rats induced by adolescent stress contribute to depression susceptibility. **Psychoneuroendocrinology**, v. 101, p. 204–215, mar. 2019.

YANKELEVITCH-YAHAV, R. *et al.* The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. **Journal of Visualized Experiments**, n. 97, p. 52587, 2 mar. 2015.

YIN, M.-C. *et al.* Bioavailability, Distribution, and Antioxidative Effects of Selected Triterpenes in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7697–7701, 8 ago. 2012.

ZAJKOWSKA, Z. *et al.* Cortisol and development of depression in adolescence and young adulthood – a systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 136, p. 105625, fev. 2022.

ZAKARIA, F. *et al.* Centella asiatica (L.) Urb. Extract ameliorates branched-chain amino acid (BCAA) metabolism in acute reserpine-induced stress zebrafish model via <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-based metabolomics approach. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 264, p. 109501, fev. 2023.

ZANATTA, M. E. D. C. *et al.* Gastroprotective Effects of the Aqueous Extract from



Taraxacum officinale in Rats Using Ultrasound, Histology, and Biochemical Analysis.

**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1–13, 21 dez. 2021.

ZGAJNAR, N. R. *et al.* Biological Actions of the Hsp90-binding Immunophilins FKBP51 and FKBP52. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, p. 52, 1 fev. 2019.

ZHANG, S. *et al.* Interaction Between Glucocorticoid Receptors and FKBP5 in Regulating Neurotransmission of the Hippocampus. **Neuroscience**, v. 483, p. 95–103, fev. 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Dopamine Receptor D2 and Associated microRNAs Are Involved in Stress Susceptibility and Resistance to Escitalopram Treatment. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 8, p. pyv025–pyv025, 5 jun. 2015.

## ANEXO A - Certificado de aprovação da pesquisa pelo CEUA da UFFS

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Potencial Terapêutico da Centella asiatica no Efeito Intergeracional do Estresse na Infância sobre Comportamentos Depressivos e Mecanismos Epigenéticos", protocolada sob o CEUA nº 1912270922 (ID 000435), sob a responsabilidade de **Zuleide Maria Ignácio e equipe; Amanda Gollo Bertollo; 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 23/12/2022.

We certify that the proposal "Therapeutic Potential of Centella asiatica in the Intergenerational Effect of Childhood Stress on Depressive Behaviors and Epigenetic Mechanisms", utilizing 225 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 1912270922 (ID 000435), under the responsibility of **Zuleide Maria Ignácio and team; Amanda Gollo Bertollo; 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 12/23/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [02/2023](#) a [01/2025](#) Área: [Ciências da Saúde](#)

Origem: [Aplicável ao Biotério](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [0 a 188 dias](#)

N: [225](#)

Linagem: [Wistar](#)

Peso: [6 a 400 g](#)

Local do experimento: Biotério da UFFS, Campus Chapecó

Realeza, 02 de janeiro de 2024



Prof. Dra. Fabíola Dalmolin  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Fronteira Sul



Biólogo Cassio Batista Marcon  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Fronteira Sul