

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

**JOÃO VICTOR LUCAS DE ALMEIDA
HAESSLLER SARTORI DE SOUZA**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO E COMPOSTO ATIVO DA
CENTELLA ASIATICA COMO POSSÍVEL TRATAMENTO PARA O TRANSTORNO
DEPRESSIVO MAIOR**

**CHAPECÓ
2024**

**JOÃO VICTOR LUCAS DE ALMEIDA
HAESSLLER SARTORI DE SOUZA**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO E COMPOSTO ATIVO DA
CENTELLA ASIATICA COMO POSSÍVEL TRATAMENTO PARA O TRANSTORNO
DEPRESSIVO MAIOR**

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Margarete Dulce Bagatini

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Zuleide Maria Ignácio

CHAPECÓ

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Almeida, João Victor Lucas de
POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO E COMPOSTO ATIVO DA
Centella asiatica COMO POSSÍVEL TRATAMENTO PARA O
TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR / João Victor Lucas de
Almeida, Haessler Sartori de Souza. -- 2024.
35 f.:il.

Orientadora: Doutora Margarete Dulce Bagatini
Co-orientadora: Doutora Zuleide Maria Ignácio
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Chapecó, SC, 2024.

1. Transtorno Depressivo maior. 2. Potencial
terapêutico da centella asiatica. 3. estresse oxidativo.
I. Souza, Haessler Sartori de II. , Margarete Dulce
Bagatini, orient. III. , Zuleide Maria Ignácio,
co-orient. IV. Universidade Federal da Fronteira Sul. V.
Título.

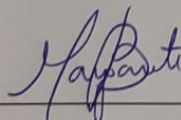
JOÃO VICTOR LUCAS DE ALMEIDA
HAESSLLER SARTORI DE SOUZA

POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO E COMPOSTO ATIVO DA
Centella asiatica COMO POSSÍVEL TRATAMENTO PARA O TRANSTORNO
DEPRESSIVO MAIOR

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

Este trabalho de conclusão foi definido e aprovado pela banca em: 20/06/2024

BANCA EXAMINADORA



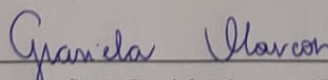
Profª Drª Margarete Dulce Bagatini- UFFS

Orientadora



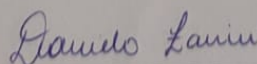
Profª Drª Zuleide Maria Ignácio - UFFS

Co-orientadora



Profª Ma Grasiela Marcon - UFFS

Avaliador



Profª Drª Daniela Zanini - UFFS

Avaliador

RESUMO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é a principal causa de adoecimento mental em todo mundo, com um grande impacto na qualidade de vida. Apesar de não haver uma completa elucidação de sua fisiopatologia, entre os fatores relevantes está o estresse na infância. Junto a isso, a falta de suporte social ao longo da adolescência pode potencializar esses traumas, agravando ou gerando um TDM. A privação materna (PM) em roedores é um modelo de estudo comportamental que mimetiza os traumas no início da vida humana. Em pessoas com TDM, foram identificadas alterações no padrão do nível sérico de marcadores inflamatórios, entre elas, o ácido tiobarbitúrico (TBARS), substâncias antioxidantes, como a Vitamina C (ácido ascórbico), os Tiois totais (PSH) e os Tiois não proteicos (NPSH). A planta medicinal *Centella asiatica* (*C. asiatica*) vem sendo estudada pelo seu possível potencial neuroprotetor e antidepressivo. Os principais objetivos deste estudo foram: avaliar o efeito do tratamento com extratos de folhas da espécie *C. asiatica* em marcadores de estresse oxidativo no sangue periférico em ratos submetidos a estresse de PM nos primeiros dias de vida. Os animais foram divididos em 5 grupos (N = 10 cada grupo): controle sem estresse + veículo (controle sem estresse); PM + veículo (controle negativo); PM + Escitalopram (controle positivo); PM + Extrato de *C. asiatica*; PM + ácido madecássico 10 mg/Kg. Os animais foram submetidos à PM por 10 (dez) dias após o primeiro dia de nascimento. Com 60 (sessenta) dias de idade, os animais foram submetidos ao tratamento crônico por 14 (quatorze) dias de acordo com o objetivo de cada grupo. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e foram retirados e armazenados seus hipocampus e o sangue. A avaliação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) nos animais em PM apresentou elevação nos parâmetros de estresse oxidativo, elevando o TBARS em ambos os sexos e reduzindo a vitamina C nas fêmeas, poupando o PSH e o NPSH de alterações. O extrato e o composto da *C. asiatica* reduziram o estresse oxidativo significativamente. O estudo é relevante para a área da Medicina, por trazer um possível auxílio em questões de saúde mental, presentes nas mais diversas áreas médicas.

Palavras chave: Transtorno depressivo maior; inflamação; *Centella asiatica*.

ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) is the most frequent cause of mental health issues in the world, mostly affecting the patient's life quality. Although its pathophysiology is not entirely understood, among the most relevant factors is the stress during childhood. In addition to that, the lack of social support during youth age can enhance these traumas, aggravating or initiating an MDD. The maternal deprivation (MP) in rodents is a behavior study model which mimics the trauma experienced in early ages of human life. Previous studies have shown the presence of modifications on the seric levels of inflammatory cytokines, as examples, the thiobarbituric acid reactive species (TBARS), and antioxidants species, such as Vitamin C (Ascorbic acid), Total Thiols (PSH), and non proteic Thiois (NPSH). Studies about the medicinal plant called *Centella asiatica* (*C. asiatica*) have been growing in number in the last years, due to its neuroprotective and antidepressant potential effects. The main purpose of this study was to evaluate the effect on inflammatory markers in peripheral blood with treatment with extract from leaves of *C. asiatica* on rodents stressed with MP on their first days of life. The animals were allocated in 5 groups (N = 10 each group): control without MP + saline (control without stress); PM + saline (negative control); MP + Escitalopram (positive control); PM + *C. asiatica* extract; MP + madecassic acid 10 mg/Kg. The animals were subject to MP during 10 (ten) days since the day they were born. With 60 (sixty) days of life, the animals received treatment during 14 (fourteen) days according to each group's goal. The assessment of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of the animals submitted to MP showed higher levels of inflammatory markers, increase in TBARS on both sexes of rodents and decrease in vitamin C on females, sparing changes on PSH and NPSH. The *C. asiatica* extract reduced the inflammation on peripheral blood, even on markers without expressive changes, demonstrating a potential anti-inflammatory effect. This study is relevant in various fields of Medicine, as it verifies a possible aid to mental health issues.

Keywords: Major depressive disorder; inflammation; *Centella asiatica*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlCl ₃	Cloreto de alumínio
AChE	Acetilcolinesterase
ALT	Alanina aminotransferase
AM	Ácido madecássico
AST	Aspartato aminotransferase
CA	Centella asiatica
C. asiatica	Centella asiatica
CID	Decomposição induzida por colisão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESI	Electropulverização
EM	Espectrometria de Massa
NF-KB	Factor nuclear kappa B
GSH-Px	Glutathione peroxidase
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LCE	Labirintos elevados em cruz
LDL-OX	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LPS	Lipopolissacarídeos
MDA	Malondialdeído
mRNA	RNA mensageiro
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico

PM	Privação maternal
PSH	Tiois Totais
MDA	Malonaldeído
NPSH	Tiois Não Proteicos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UNOCHAPECÓ	Universidade Comunitária da Região de Chapecó
VIT C	Ácido Ascórbico

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico da análise de Tiois não proteicos (NPSH) em machos.....	23
Gráfico 2 – Gráfico da análise de Tiois não proteicos (NPSH) em fêmeas.....	24
Gráfico 3 – Gráfico de análise de Tiois Totais (PSH) em machos	25
Gráfico 4 – Gráfico de análise de Tiois Totais (PSH) em fêmeas	25
Gráfico 5 – Gráfico de análise do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em machos	26
Gráfico 6 – Gráfico de análise de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em fêmeas.....	27
Gráfico 7 – Gráfico de análise de Vitamina C (Ácido ascórbico) em machos.....	28
Gráfico 8 – Gráfico de análise de Vitamina C (Ácido ascórbico) em fêmeas.....	28

APÊNDICES

APÊNDICE A – Protocolo de separação de sangue periférico (PBMC) adaptado para murinos	36
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	16
4.2 PRODUÇÃO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE <i>C. asiatica</i>	16
4.3 ANÁLISES QUÍMICAS DE EXTRATOS DE <i>C. asiatica</i>	17
4.4 PRIVAÇÃO MATERNAL.....	17
4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS.....	17
4.6 COLETA DE PBMCs.....	18
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE TBARS.....	18
4.8 DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS PSH e NPSH.....	18
4.9 QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA C.....	19
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4.11 ASPECTOS ÉTICOS.....	19
5 RESULTADOS.....	20
6 DISCUSSÃO.....	26
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
REFERÊNCIAS.....	29
APÊNDICE A - Protocolo de separação de sangue - PBMC - adaptado para murinos...	33

1 INTRODUÇÃO

Estudos recentes divulgados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) destacam o Transtorno Depressivo Maior (TDM) como uma das principais causas de incapacidade global, afetando aproximadamente 280 milhões de indivíduos. O TDM, além de sua alta prevalência, emerge como o principal precursor do suicídio, sendo a quarta principal causa de morte entre pessoas de 15 a 29 anos, contribuindo para mais de 700.000 óbitos ao ano (WHO, 2017).

A complexidade do TDM transcende a esfera psiquiátrica, estendendo-se para além da dimensão física, e frequentemente associando-se a doenças médicas, notadamente crônicas e sistêmicas. Esta ocorrência suscita questionamentos acerca do conceito de comorbidade, exigindo uma distinção clara entre doenças de naturezas distintas. O desafio diagnóstico e terapêutico é acentuado pela sobreposição de sintomas de condições físicas e neurovegetativos característicos da depressão maior (THOM et al., 2019). Comorbidades como doenças metabólicas, cardiovasculares e dependência química são corriqueiramente observadas, contribuindo para uma redução substancial na expectativa e qualidade de vida dos indivíduos acometidos (NEMEROFF; OWENS, 2002).

Sendo reconhecido como uma afecção multifatorial, o TDM é influenciado por diversos fatores, incluindo predisposição genética, estresse e processos patológicos, como a inflamação. Seus sintomas, associados a deficiências químicas e/ou estruturais nas regiões cerebrais corticolímbicas, abrangem uma variedade de aspectos incluindo os emocionais, motivacionais, cognitivos e físicos. Apesar de diversos estudos dedicados ao TDM, nenhuma hipótese isolada consegue abarcar de maneira abrangente todos os mecanismos e sintomas, dada a notável heterogeneidade da condição. Contudo, observa-se uma convergência em direção a uma fisiologia compartilhada, embora não seja uma constante universal (FILATOVA et al., 2021).

O estresse psicológico, um fator fundamental, pode induzir uma série de modificações na psique e no sistema nervoso central (YANG et al., 2015). No início da vida, esse estresse está correlacionado com a gravidade da condição e uma resposta subótima ao tratamento, tanto em humanos quanto em modelos animais (IGNÁCIO et al., 2017). Roedores submetidos a protocolos de privação materna (PM) nos primeiros dias de vida exibiram níveis elevados de ansiedade em labirintos elevados em cruz (LCE) e comportamentos anedóticos e depressivos em testes de anedonia (Splash test) e natação forçada (NF) (IGNÁCIO et al., 2017).

Considerando a menor resposta ao tratamento convencional em alguns casos de TDM, a prevalência significativa de efeitos adversos associados a esses medicamentos e o elevado custo financeiro para os portadores em comparação com não portadores (CROWN et al., 2002), torna-se imperativo buscar alternativas terapêuticas e compreender seus mecanismos. Nesse contexto, a *Centella asiatica* (*C. asiatica*) planta amplamente utilizada na medicina ayurvédica, medicina tradicional chinesa e em outras tradições do sudeste asiático, emerge como uma potencial solução. Estudos já indicam seus potenciais efeitos ansiolíticos, anticonvulsivantes e neuroprotetores, sugerindo uma possível eficácia no tratamento do TDM. Componentes como a *C. asiatica* (CA) e o ácido madecássico (AM), juntamente com ácidos cafeoilquínicos, destacam-se como compostos ativos associados às propriedades neurotrópicas e neuroprotetoras da *C. asiatica* (JANA et al., 2010; GRAY et al., 2018).

Diante da necessidade evidente de alternativas terapêuticas e da importância de investigações direcionadas às vias inflamatórias no TDM, este estudo propõe-se a analisar o potencial terapêutico da CA como uma abordagem para casos resistentes aos tratamentos convencionais, a partir da análise dos marcadores do estresse oxidativo: Tióis totais, Tióis não proteicos, Ácido tiobarbitúrico e Vitamina C, em sangue periférico.

O desenvolvimento desta pesquisa visa estimular futuras investigações farmacológicas na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e contribuir para o avanço do conhecimento sobre os marcadores do estresse oxidativo. Caso o potencial terapêutico da CA seja confirmado, esta substância poderá integrar efetivamente o arsenal terapêutico para o tratamento do TDM. Além disso, os medicamentos de origem natural apresentam vantagens, como custos reduzidos e menor incidência de efeitos adversos, representando uma alternativa promissora para a população afetada pelo TDM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito do tratamento com extrato de folhas da espécie *C. asiatica* (CA) e o composto ativo ácido madecássico (AM) sobre os mecanismos biomoleculares de estresse oxidativo em ratos submetidos a estresse de privação materna nos primeiros dias de vida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de TBARS em sangue periférico de ratos submetidos a estresse de privação materna nos primeiros dias de vida e tratados com CA e AM.
- Medir os níveis de defesas antioxidantes NPSH, PSH e Vitamina C em sangue periférico de ratos submetidos a estresse de privação materna nos primeiros dias de vida e tratados com CA e AM.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Ao longo da história, a humanidade enfrentou desafios relacionados à saúde, buscando métodos para lidar com sintomas e cuidados diários. Este processo, permeado por tentativas e erros, evoluiu ao longo do tempo, refinando-se junto aos avanços científicos. No entanto, mesmo antes da existência de tratamentos medicamentosos formais, as plantas desempenharam um papel protagonista, servindo como a base para numerosos compostos medicinais e representando uma constante no processo de cura (BADKE et al., 2012).

No cenário contemporâneo, a depressão, classificada pela OMS como um transtorno de humor, apresenta uma complexidade notável, com uma ampla gama de possíveis causas e manifestações clínicas. Este transtorno exerce um impacto significativo na qualidade de vida dos indivíduos afetados e de seus familiares. Apesar dos avanços substanciais na psicofarmacologia ao longo das décadas, o tratamento do TDM continua sendo um desafio, considerando a crescente incidência da doença. A evolução dos medicamentos antidepressivos oferece uma variedade considerável de opções, e a escolha da classe de medicamento adequada para cada paciente recai sobre a decisão do médico (NEVES, 2015).

Embora os antidepressivos possuam uma notável capacidade de tratar transtornos depressivos em muitas pessoas, é importante destacar que não apresentam resultados imediatos e não são eficazes para todos os pacientes (SOUZA; KOPITKE, 2016). A falta de respostas pode estar associada à subadesão ao tratamento, um fenômeno comum, especialmente no caso dos antidepressivos. Isso se deve, em parte, ao tempo necessário para que os efeitos se manifestem, mas também aos efeitos adversos que geralmente ocorrem, principalmente no início do tratamento. Vale ressaltar os riscos associados à interrupção abrupta dessas medicações, que podem desencadear a Síndrome de descontinuação,

caracterizada por náuseas, cefaleia, letargia, ansiedade, parestesias, confusão, tremores, sudorese, insônia, irritabilidade e distúrbios de memória (SABELLA, 2018).

Paralelamente à não adesão ao tratamento medicamentoso, surge a questão da resistência a estes, um fenômeno que muitas vezes prolonga a busca pelo fármaco ideal e, podendo inclusive afastar o paciente da terapêutica. Essa relação entre não adesão/resistência e o sistema de saúde brasileiro, por vezes, deficitário no acompanhamento desses pacientes, resulta em efeitos adversos adicionais a cada interrupção e tentativa de tratamento (NEVES, 2015; SOUZA; KOPITTKE, 2016).

Diante dos desafios mencionados, aliados à vulnerabilidade social e econômica existente no Brasil, torna-se imperativo buscar tratamentos mais acessíveis, com menores adversidades e eficácia comparável. Retornando às raízes da medicina, as plantas medicinais emergem como alternativas bem estudadas, tendo como exemplos o uso da Erva de São João (*Hypericum perforatum*) e a Camomila (*Matricaria recutita* L.). Essas plantas têm se mostrado benéficas no tratamento do TDM, especialmente em casos leves e moderados, quando cultivadas e administradas de forma controlada (SOUZA; GODINHO, 2020; LIMA; FILHO; OLIVEIRA, 2019).

A leitura aprofundada dos artigos ressalta a relevância das plantas medicinais como terapia coadjuvante no TDM, proporcionando uma alternativa para pacientes não responsivos aos tratamentos convencionais. Além disso, há a vantagem de menor custo, da ampla aceitação devido à sua presença no cotidiano das pessoas e da baixa toxicidade e efeitos colaterais (SOUZA; GODINHO, 2020; LIMA; FILHO; OLIVEIRA, 2019).

Diante do exposto, outra planta de destaque é a *C. asiatica*, utilizada por séculos na medicina ayurvédica para tratar diversas condições, como doenças neuropsiquiátricas, asma, úlceras, feridas e eczemas (CHOPRA et al., 1956). Na Tailândia, ela é empregada no tratamento de infecções e processos inflamatórios (PUNTUREE et al., 2004). Estudos recentes sobre a *C. asiatica* destacam seu potencial em efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. O extrato da planta demonstrou efeitos positivos em ratos, aumentando os níveis hepáticos de superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px), enquanto reduzia malondialdeído (MDA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (ZHAO et al., 2014). Além disso, teve efeitos anti-inflamatórios ao inibir a expressão sérica de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, e imunoglobulina E (IgE), e também inibiu a liberação de óxido nítrico (NO), ciclo-oxigenase-2 (COX-2), atividade de ligação ao DNA de fator nuclear kappa B (NF-KB) pós estímulo de

lipopolissacarídeos (LPS) em macrófagos de ratos tipo RAW264.7 (PARK et al., 2017). Além dos usos já explorados, novos potenciais vêm sendo demonstrados, como um possível papel antidepressivo e ansiolítico. Um estudo em ratos submetidos à bulbectomia olfatória revelou que o extrato de *C. asiatica* reverteu sintomas depressivos de maneira semelhante aos antidepressivos imipramina, fluoxetina e desipramina. Além disso, observou-se uma redução no comportamento ansioso no teste do labirinto em cruz elevado (KALSHETTY et al., 2012).

Como já ressaltado, o TDM é uma síndrome complexa, envolvendo alterações anatômicas e funcionais que têm origem precoce no desenvolvimento cerebral. Em indivíduos com predisposição genética, os fatores de estresse precoce podem mediar não apenas o risco genético, mas também a expressão gênica (LIMA et al., 2012). Esse processo ocorre principalmente na primeira infância, onde várias situações podem impactar negativamente o desenvolvimento cerebral adequado. Assim, uma hipótese amplamente aceita relaciona experiências negativas nesse período com um maior risco de transtornos mentais, incluindo o TDM. Modelos animais, como o protocolo de PM, são utilizados para investigar essa relação, fornecendo uma forte correlação entre a causa e consequência (MARCO et al., 2015). Esse protocolo consiste na privação dos filhotes por 3 horas ao dia de sua mãe nos primeiros 10 dias de vida, servindo como um estressor indutor de TDM (IGNÁCIO et al., 2017b).

O estresse oxidativo, caracterizado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, pode danificar células e tecidos, desencadeando uma resposta inflamatória (BARBOSA et al., 2010). Esta resposta, resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF- α , que são frequentemente encontrados em níveis elevados em indivíduos com depressão. Essas citocinas pró-inflamatórias podem afetar negativamente a função cerebral, alterando a neurotransmissão e a neuroplasticidade, contribuindo assim para os sintomas depressivos (FILATOVA et al., 2021).

A instauração do fenômeno do estresse oxidativo emerge da discrepância entre os agentes oxidantes e antioxidantes, favorecendo a produção desmedida de radicais livres ou comprometendo a eficiência na sua eliminação. Este fenômeno desencadeia a oxidação de biomoléculas, resultando na perda de funcionalidades biológicas e/ou perturbações na homeostase, gerando danos oxidativos contra as células e tecidos (BARBOSA et al., 2010).

Ao olhar esses biomarcadores, destacam-se neste estudo marcadores como o Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), e substâncias antioxidantes como Tióis totais (PSH), Tióis não proteicos (NPSH) e ácido ascórbico (Vitamina C), que agem tentando conter a oxidação causada por essa inflamação.

Embora os níveis de TBARS possuam uma especificidade analítica e robustez limitadas, ele é frequentemente empregado como medida abrangente da peroxidação lipídica em fluidos biológicos. Sendo visto comumente como um indicador eficaz dos níveis de estresse oxidativo em uma amostra biológica, contanto que a amostra tenha sido corretamente manipulada e conservada (AGUILAR, BORGES, 2020).

Os PSH e os NPSH são importantes marcadores de estresse oxidativo ao representarem a relação oxidantes-antioxidantes em nível sérico, significando que essa relação desbalanceada representa um estresse oxidativo no organismo (RODRIGO et al., 2007).

Tratando-se da Vitamina C, sua ação é baseada na inibição de espécies reativas de oxigênio que possuem ação oxidante, agindo na proteção contra danos de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) (RODRIGO et al., 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia aplicada ao estudo é do tipo quantitativo, preterindo coleta de dados in vivos e moleculares. A amostragem do estudo envolveu $n = 50$ ratos, sendo $n = 25$ machos e $n = 25$ fêmeas, criados em ambiente controlado, isto é, com protocolo de ambiente, alimentação, temperatura e bebida restritas ao laboratório.

4.1 MATERIAL VEGETAL

Os materiais vegetais de *C. asiatica* foram coletados em Chapecó (SC, Brasil) (27 ° 01 '55.14 'S e 52 ° 47 '29.42' O), em Outubro de 2021. A identificação botânica foi feita pelo Prof. Adriano Dias de Oliveira, curador do Herbário da Universidade Comunitária da Região de Chapecó (Unochapecó) onde uma exsicata foi depositada.

4.2 PRODUÇÃO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *C. asiatica*

As amostras de *C. asiatica* foram secas à temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), trituradas em moinho de facas (Ciemlab®, CE430), selecionadas em peneira (425 μm ; 35 Tyler/Mesch), identificadas e armazenadas com proteção contra a luz. Os extratos foram produzidos através de maceração (5 dias) à temperatura ambiente, utilizando folhas moídas a seco da planta (100

g) e etanol a 70% (1:20, p/ v). Após a filtração através do funil de Büchner, os extratos hidroalcoólicos foram concentrados via evaporação sob pressão reduzida, liofilizados, pesados e armazenados a -20 °C.

4.3 ANÁLISES QUÍMICAS DE EXTRATOS DE *C. asiatica*

O extrato de *C. asiatica* foi inicialmente analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando padrões externos para identificação de compostos. Na sequência para identificação inequívoca dos compostos, o extrato foi analisado por Espectrometria de Massa (EM). A infusão direta de fluxo do extrato foi realizada em um analisador Braker SolariX FT-ICR-MS equipado com fonte de ionização por eletropulverização (ESI), em modo negativo, taxa de fluxo de gás de secagem 3,0 L/min, temperatura do gás de secagem 200 °C, tensão de pulverização de - 0,5 kV, tensão capilar de - 4,5 kV, lente ECD de -10 V, amostra de fluxo de 5 µl/h e taxa de fluxo de gás nebulizador de 0,4 bar.

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

4.4 PRIVAÇÃO MATERNA

Os filhotes foram privados da mãe por 3 h/dia nos primeiros 10 dias após o nascimento. A PM consistiu na remoção dos filhotes da gaiola. Os animais não privados (controles) permaneceram imperturbados na gaiola original com a mãe. Os animais foram desmamados somente no 21º dia após o nascimento dos filhotes, quando permaneceram em condições padrão. Foram mantidos em 5 animais por caixa, com ciclo claro/escuro de 12 horas (das 07:00 às 19:00 horas, com luz a partir das 7:00 horas), comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a uma temperatura de 23 ± 1 °C.

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS

Os animais foram submetidos ao protocolo de PM nos 10 primeiros dias de vida. Quando atingiram 60 dias de vida, os animais foram submetidos a um tratamento crônico de extrato de *C. asiatica* por 14 dias. A administração foi feita pelo método de gavagem. Os 60 animais foram divididas em 5 grupos (N = 10 cada grupo): Controle sem estresse + veículo (Controle sem estresse); PM + veículo (Estresse + Tratamento controle salina); PM + Escitalopram (Estresse + Tratamento controle positivo); PM + Extrato de Ácido Madecássico; PM + Extrato de *C. asiatica*. O controle positivo escitalopram é um antidepressivo clássico do grupo dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina.

4.6 COLETA DE PBMCs

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram coletadas usando o sistema de gradiente Ficoll-Histopaque. As células foram armazenadas usando meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com soro bovino fetal, antibióticos e antifúngicos. O sangue foi processado e as amostras cerebrais foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise dos parâmetros bioquímicos e biomoleculares (DA SILVA *et al.*, 2023).

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE TBARS

A peroxidação lipídica é avaliada pela quantificação de TBARS, principalmente malondialdeído (MDA). O produto que foi gerado é um cromóforo rosa lido em 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol MDA/mL.

4.8 DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS PSH e NPSH

Ambos os níveis de tiois foram determinados de acordo com Ellman, (1956) com adaptações. Este método consiste na redução de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) medido a 412 nm. Para o ensaio de PSH, 40 µL de sobrenadante foi adicionado em placa de

96 poços a 200 μ L de tampão fosfato de potássio (PPB) (1 M, pH 6,8) e 20 μ L de DTNB e lidos imediatamente. O mesmo procedimento experimental foi realizado para os NPSH, exceto que as amostras foram desproteinizadas pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 10% antes da análise. Os resultados colorimétricos foram determinados usando uma curva padrão de cisteína e expressos em μ M.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE VITAMINA C

A quantificação dos níveis de VIT. C foi realizada por método previamente descrito. O método identifica a geração de um cromogênio laranja produzido pela reação da vitamina C com dinitrofenilhidrazina (DNPH) a 37°, medida espectrofotometricamente a 520 nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico/mL de soro.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as medições foram realizadas estatisticamente por análise de variância seguida pelo teste post hoc apropriado usando o *software GraphPad Prism 9*. Todos os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os grupos em relação às variáveis estudadas foram avaliadas por meio da análise de ANOVA one-way. As diferenças na probabilidade de rejeição da hipótese nula em $<5\%$ ($p < 0,05$) são consideradas estatisticamente significativas. A significância estatística definida para valores de p de $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$.

4.11 ASPECTOS ÉTICOS

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

Essa pesquisa utilizou de modelos animais com o objetivo de beneficiar o conhecimento científico (GUIMARAES; FREIRE; MENEZES, 2016). Foi utilizado o número necessário de animais para que não haja o sacrifício desnecessário. Os pesquisadores precisaram apresentar um comprovante de que realizaram uma capacitação para entrarem em contato com os ratos, com o objetivo de garantir o menor sofrimento possível e que os dados verificados sejam precisos e fidedignos. Os testes e manipulações realizadas pelos

pesquisadores nos roedores já foram testados e utilizados anteriormente, para não ser gerado sofrimento desnecessário (ALMEIDA; NETO; ALMEIDA, 2016).

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

O método de decapitação foi utilizado para a coleta do sangue periférico e separação de tecidos cerebrais. A decapitação é um método mecânico de eutanásia, com seu uso justificado por não interferir nos resultados bioquímicos necessários na pesquisa e por permitir a retirada de estruturas cerebrais e outros tecidos sem alterações químicas. Outras formas de eutanásia poderiam comprometer os testes bioquímicos por alterar as substâncias testadas. Para uma anestesia pré-decapitação optou-se por usar o Dióxido de carbono (CO_2), por sua rápida ação depressiva, analgésica e anestésica sem deixar resíduos nos tecidos, possibilitando que os testes post mortem tenham validade científica. Os efeitos produzidos pelo CO_2 iam conforme a concentração, e para promover sedação a concentração precisa permanecer entre 5 a 8% (COMISSÃO DE ÉTICA, BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL/CFMV, 2013).

5 RESULTADOS

Em primeira análise, ao observar os gráficos 1 e 2 relacionados à concentração periférica de NPSH, percebemos que sua concentração entre as populações de ratos submetidos ao estresse e os não submetidos são estatisticamente iguais. No entanto, ao utilizarmos a CA, foi possível perceber que os valores desse marcador no sangue periférico foram significativamente aumentados. Assim, por se tratar de um marcador protetor, mesmo que os valores entre a população estressada e não estressada tenham sido próximas, o aumento do NPSH no sangue periférico nos mostra a eficácia do tratamento com a CA, apresentando um $p < 0,05$ tanto na população de machos quanto na população de fêmeas.

Gráfico 1: Gráfico da análise de Tiois não proteicos (NPSH) em machos

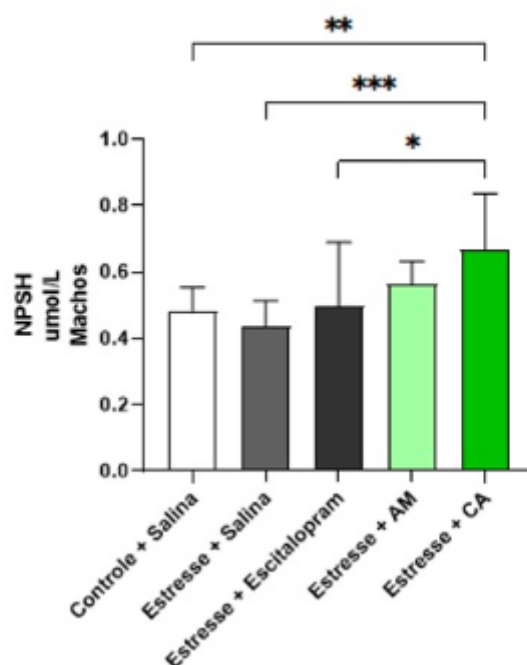
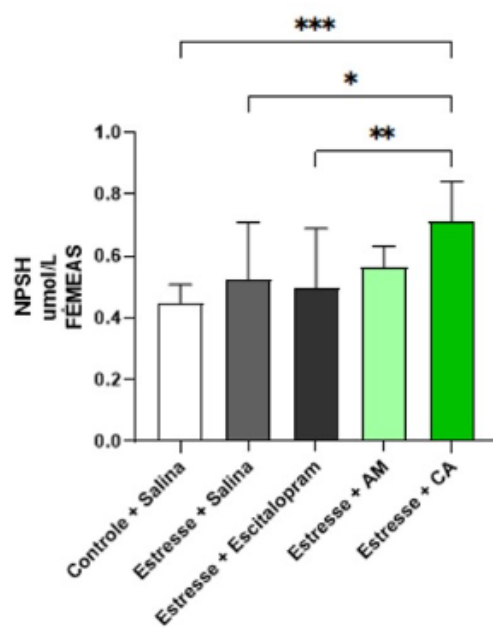
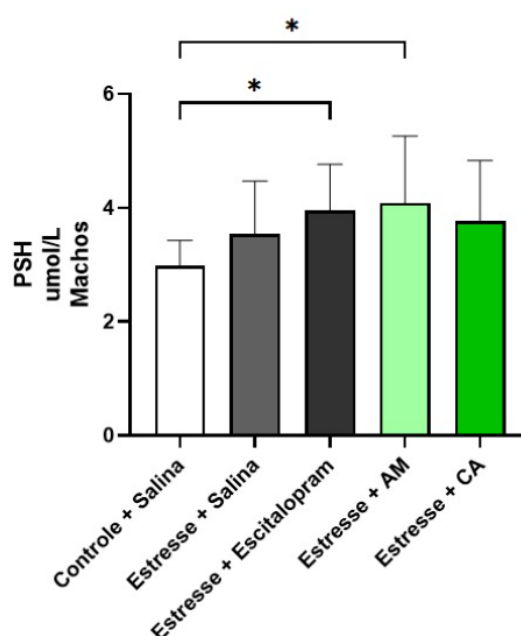
Fonte: Gráfico gerado pelo software *GraphPad Prism 9*

Gráfico 2: Gráfico da análise de Tiois não proteicos (NPSH) em fêmeas

Fonte: Gráfico gerado pelo software *GraphPad Prism 9*

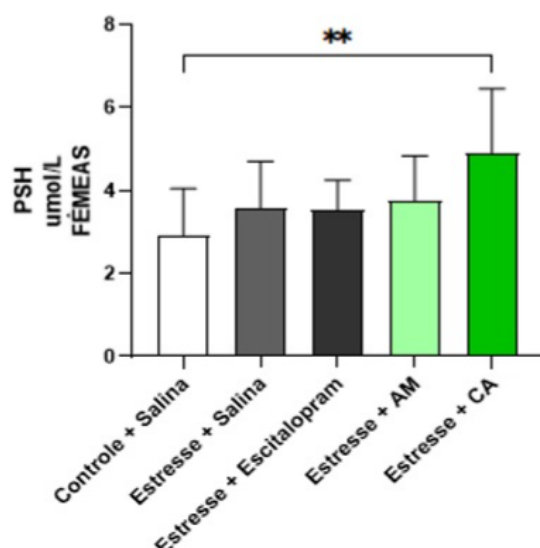
Em outra análise, ao observarmos os gráfico 3 e 4 relacionado aos níveis de PSH, da mesma forma que o NPSH, esperava-se que com o estresse sua concentração se mantivesse ou diminuísse, e com a utilização da CA seus níveis se elevassem, indicando um aumento na proteção contra oxidantes. Dessa forma, ao analisarmos o grupo dos ratos machos e o de fêmeas, apesar da não significância em relação ao estresse, percebemos que quando comparados ao controle, a CA se mostrou eficiente no grupo das fêmeas e no grupo dos machos há uma tendência, uma vez que o AM que é o princípio ativo da CA se mostrou eficiente.

Gráfico 3: Gráfico da análise de Tiois Totais em machos



Fonte: Gráfico gerado pelo software *GraphPad Prism 9*

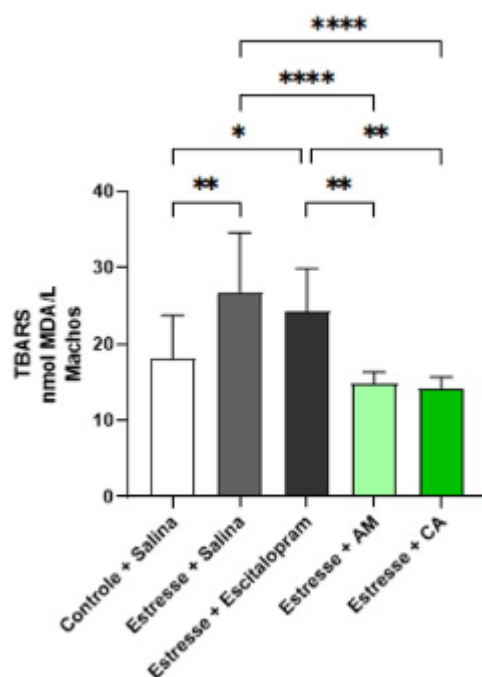
Gráfico 4: Gráfico da análise de Tiois Totais em Fêmeas



Fonte: Gráfico gerado pelo software *GraphPad Prism 9*

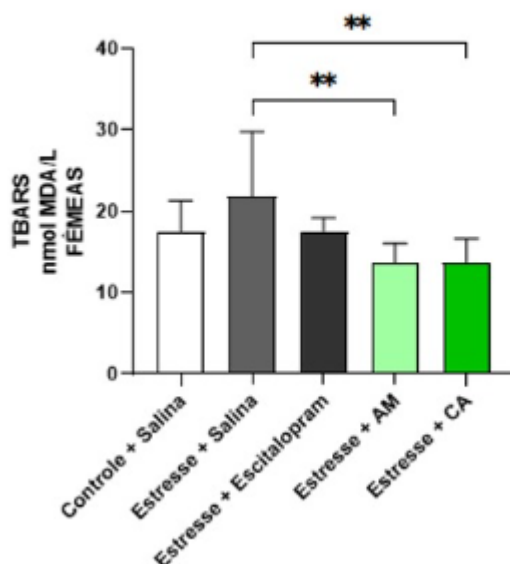
Em seguida, ao analisar a concentração de TBARS nos gráficos 5 e 6, percebemos que, os ratos submetidos ao estresse apresentavam uma maior concentração deste marcador em sangue periférico como esperado. Dessa forma, em ambos os grupos, percebemos que a CA reduziu significativamente a proporção de TBARS, apresentando um $p < 0.05$.

Gráfico 5: Gráfico de análise do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em machos



Fonte: Gráfico gerado pelo software *GraphPad Prism 9*

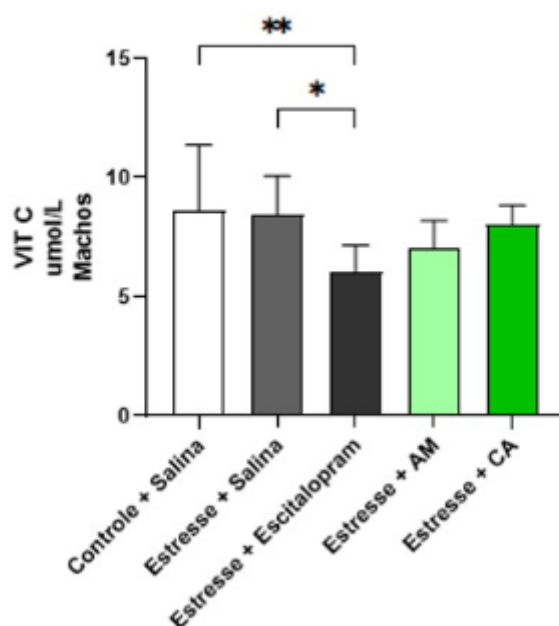
Gráfico 6: Gráfico de análise do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) em fêmeas



Fonte: Gráfico gerado pelo software *GraphPad Prism 9*

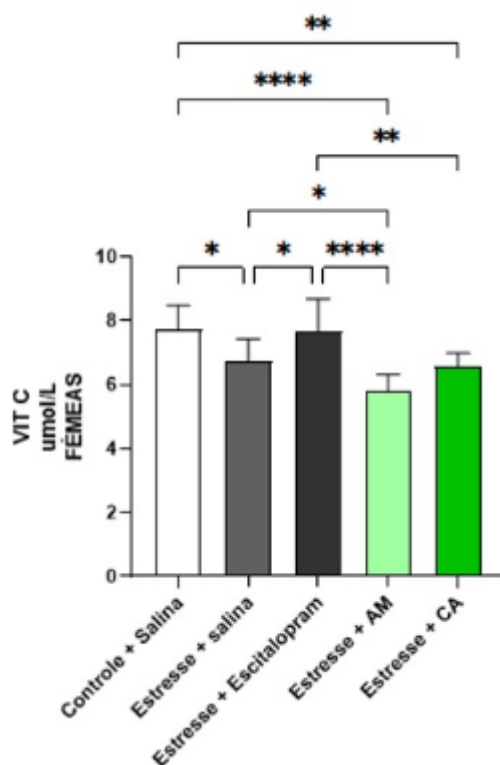
Por fim, ao explorar os gráficos 7 e 8 relacionados à Vitamina C, percebemos que, por apresentar um papel protetor, esperava-se uma redução de seus valores em ratos submetidos ao estresse, e um aumento após o tratamento com a CA. No entanto, no grupo de fêmeas, no qual ocorreu uma diminuição da Vitamina C, a CA não foi capaz de elevar seus valores. Ao passo que, na população de machos, o estresse não obteve um valor expressivo na redução da Vitamina C.

Gráfico 7: Gráfico de análise de Vitamina C (Ácido ascórbico) em machos



Fonte: Gráfico gerado pelo software *GraphPad Prism 9*

Gráfico 8: Gráfico de análise de Vitamina C (Ácido ascórbico) em fêmeas



Fonte: Gráfico gerado pelo software *GraphPad Prism 9*

6 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou o efeito da *C. asiatica*, seu composto ativo ácido madecássico (AM) e o escitalopram, um antidepressivo clássico, sobre marcadores inflamatórios no sangue periférico de ratos submetidos ao protocolo de PM no início da vida.

Diversos estudos demonstraram a clara influência de traumas na infância em psicopatologias futuras, além de uma maior resistência para os tratamentos convencionais em casos de TDM. Desta forma, torna-se possível a reprodução desta ligação em ambiente controlado, por meio da PM em murinos e da sua avaliação por meio de parâmetros inflamatórios (DIEHL, 2009).

Dentre os 6 parâmetros avaliados em nosso estudo, 3 grupos demonstraram significância quando comparados ratos submetidos e não submetidos à PM. Todavia, vale destacar que este estudo não observou parâmetros comportamentais. Além disso, a existência de outros estudos que demonstraram sucesso no estresse por meio da PM, revelando uma necessidade de mais estudos na área para esclarecer melhor a relação entre cada antioxidante e os radicais livres, além do tempo necessário para observar esse impacto em níveis séricos. (WEI et al. 2021).

Quanto aos tratamentos, foi observado que o extrato de CA (30 mg/kg) e AM (10 mg/kg) diminuíram parâmetros de estresse oxidativo, valorizando ainda mais o potencial terapêutico do tratamento natural. Percebe-se que apresentaram resultados semelhantes, ou melhores que o escitalopram, um antidepressivo clássico pertencente ao grupo dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina. Junto a isso, reduziram sintomas de depressão e comportamentos tipo depressivos em modelos animais, demonstrando ser um composto que atua positivamente em vários mecanismos biológicos importantes para a proteção neuronal e redução da inflamação (MATCHKOV et al., 2015; MUNZER et al., 2013; SEO et al., 2017; WOLKOWITZ et al., 2011).

O TBARS é um marcador importante para avaliação do dano celular pelo estresse oxidativo, e foi o único marcador com significância em relação à PM em ambos os grupos. A CA e o AM apresentaram sucesso na redução do TBARS na amostra de sangue periférico.

Já em relação aos marcadores em que não se obteve significância sobre o estresse, pode-se observar uma atividade da CA e do AM em relação ao controle, demonstrando redução do estresse oxidativo mesmo em comparação com o basal. Conclui-se que se faz necessário novos estudos para observar sua atuação individualmente em mais marcadores em

situação de aumento dos mesmos por meio do estresse oxidativo. E espera-se uma redução dos seus níveis devido à atuação da CA.

Alterações no metabolismo do NPSH em associação com o estresse oxidativo tem sido relacionado com a patogenicidade de diversas doenças, assim como o TDM (BARBOSA et al., 2010). A VIT. C mostrou significância no grupo das fêmeas quanto à PM. Avaliando-se outros fatores que influenciam nessa relação, a eficácia de um antioxidante específico pode ser influenciada pela localização intracelular ou pelo tipo de tecido em que está presente. Por exemplo, a VIT. C demonstra uma atividade antioxidante significativa contra radicais livres produzidos em ambientes aquosos. Contudo, sua capacidade de inibir os radicais livres envolvidos na peroxidação lipídica em ambientes lipídicos pode ser limitada, sendo essa a relação com o TBARS (BARBOSA et al., 2010).

Os resultados nos marcadores de estresse oxidativo observados no presente estudo assim como os resultados na literatura científica sobre as ações biológicas da espécie CA e seu composto ativo AM destacam a importância da continuidade nas análises sobre o perfil anti inflamatório e antidepressivo. Ainda não há estudos na literatura que avaliem o efeito da CA e o AM em humanos sobre marcadores inflamatórios. É importante que novas pesquisas sejam realizadas para identificar e elucidar os mecanismos pelo qual a CA e o composto ativo AM apresentam potencial antidepressivo e anti-inflamatório no modelo animal de PM.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante de tudo, nosso trabalho mostrou, a partir da avaliação de PBMCs nos animais em PM, redução significativa nos parâmetros de estresse oxidativo a partir da ação do extrato e o composto da C. asiática. Dessa forma, torna-se perceptível sua relevância para a área da Medicina, por trazer um possível auxílio em questões de saúde mental, presentes nas mais diversas áreas médicas.

Vale destacar, a importância de um olhar mais cuidadoso na medicina para com a saúde mental, especialmente para o seu tratamento, que por muitas vezes é um grande desafio para a classe médica. Com isso, opções de tratamento que oferecem eficácia e menos efeitos adversos são de grande ajuda.

Recomendamos a realização de novos estudos com um espectro mais amplo de marcadores, observando-se também a relação entre si dos mesmos e a relação entre prioridade

ou não do consumo de antioxidantes quando em estresse oxidativo. Além do avanço nas pesquisas com a CA e do AM devido ao potencial terapêutico demonstrado no estudo.

REFERÊNCIAS

AGUILAR DIAZ DE LEON., J., & BORGES, C. R. (2020). Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. **Journal of visualized experiments : JoVE**, (159), 10.3791/61122. DOI: <https://doi.org/10.3791/61122>

ALMEIDA, I; NETO, J; ALMEIDA, T, B;. Princípios Básicos de Pesquisa com Animais de Laboratório. IFS, Sergipe, v. 1, ed. 1, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ifs.edu.br/biblioteca/bitstream/123456789/642/1/Principios%20basicos%20de%20pesquisa%20com%20animais%20de%20laboratorio.pdf> Acesso em 25 de novembro de 2024.

ARNHOLD, A. L.; HECK, T. G. Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e sua importância para a avaliação da peroxidação lipídica em diversas aplicações. **Salão do Conhecimento**, 11 ago. 2014. Disponível em: <https://www.publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/salaoconhecimento/article/view/3423> Acesso em: 05 de março de 2024.

BADKE, M. R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 21, p. 363–370, jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-07072012000200014>

BARBOSA K.B.F et.al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr** [Internet]. 2010Jul;23(4):629-43. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

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

CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. Glossary of Indian Medicinal Plants. Council of Scientific & Industrial Research, New Dheli, 1956 DOI: <https://doi.org/10.1086/402350>

COMISSÃO DE ÉTICA, BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL/CFMV. 29 de janeiro de 2012. Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais: Conceitos e Procedimentos, [S. l.], 12 jan. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353513/>. Acesso em 14 de novembro de 2023.

CROWN W.H., et.al. The impact of treatment resistance in health care utilisation and costs. **J. Clin Psychiatry** 2002; 63:963-971. DOI: 10.4088/jcp.v63n1102

DA SILVA, Gilnei Bruno *et al*, Rosmarinic acid decreases viability, inhibits migration and modulates expression of apoptosis-related CASP8/CASP3/NLRP3 genes in human metastatic melanoma cells, **Chemico-Biological Interactions**, v. 375, p. 110427, 2023. DOI: 10.1016/j.cbi.2023.110427

DIEHL, L. A. Separação materna como possível fator de risco para o desencadeamento do transtorno de estresse pós-traumático : um modelo em animais de experimentação. 2009.

Disponível em:

<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/18211/000727996.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 22 de abril de 2024.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1 maio 1959. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

FILATOVA, E. V.; SHADRINA, M. I.; SLOMINSKY, P. A. Major Depression: One Brain, One Disease, One Set of Intertwined Processes. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1283, 21 maio 2021. DOI: [10.3390/cells10061283](https://doi.org/10.3390/cells10061283)

GRAY, N. E. et al. Centella asiatica - Phytochemistry and mechanisms of neuroprotection and cognitive enhancement. **Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 17, n. 1, p. 161–194, fev. 2018. DOI: [10.1007/s11101-017-9528-y](https://doi.org/10.1007/s11101-017-9528-y)

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. C.; MENEZES, L. M. B. Utilização de animais e pesquisa: Breve revisão da legislação. **Rev. Bioética**, Fortaleza, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-80422016242121>

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, 1 mar. 2017. DOI: [10.1016/j.bbr.2016.11.044](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.044)

Impacto da suplementação de Vitamina C sobre parâmetros de estresse oxidativo e imunidade em camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida | UFPel. Disponível em: <<https://institucional.ufpel.edu.br/projetos/id/p6297>>. Acesso em: 3 mar. 2024.

JANA, U., et.al. A clinical study on the management of generalized anxiety disorder with Centella asiatica. **Nepal Med Coll J.**, v. 12, p. 8-11, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20677602/> Acesso em: 30 de novembro de 2023.

Kalshetty, Padmaja et al. “Efeitos antidepressivos do extrato padronizado de Centella asiatica L em modelo de bulbectomia olfatória.” *Biomedicina e Patologia do Envelhecimento* 2 (2012): 48-53. DOI: [10.1016/J.BIOMAG.2012.03.005](https://doi.org/10.1016/J.BIOMAG.2012.03.005)

GL, LIMA; SS, LIMA FILHO; RO, OLIVEIRA. Aspectos farmacológicos da Matricaria Recutita (camomila) no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada e sintomas depressivos, 2019. DOI: [10.5380/acd.v20i2.66119](https://doi.org/10.5380/acd.v20i2.66119)

LIMA-OJEDA, J. M.; RUPPRECHT, R.; BAGHAI, T. C. Neurobiology of depression: A neurodevelopmental approach. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 19, n. 5, p. 349–359, 4 jul. 2018. DOI: [10.1080/15622975.2017.1289240](https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1289240)

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. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975583/> Acesso em: 23 de março de 2024.

- MARCO, E. M., et.al. The Maternal Deprivation animal model revisited. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2015. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.01.015
- MATCHKOV, V. V., et.al. Chronic selective serotonin reuptake inhibition modulates endothelial dysfunction and oxidative state in rat chronic mild stress model of depression. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 8, p. R814–R823, 15 out. 2015. DOI: 10.1152/ajpregu.00337.2014
- MUNZER, A., et.al. Impact of Antidepressants on Cytokine Production of Depressed Patients in Vitro. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2227–2240, 19 nov. 2013. DOI: 10.3390/toxins5112227
- NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci**, v. 5, p. 1068-1070, 2002. DOI: 10.1038/nn943
- NEVES, A. L. A. Tratamento farmacológico da depressão. **Revista da faculdade de ciências da saúde**, Porto, 2015. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5309/1/PPG_17718.pdf Acesso em: 22 de Outubro de 2023.
- PARK, J.H., et.al. Anti-Inflammatory Effect of Titrated Extract of Centella asiatica in Phthalic Anhydride-Induced Allergic Dermatitis Animal Model. **Int J Mol Sci.**, 2017 DOI: 10.3390/ijms18040738
- PUNTUREE, K.; WILD, C.P.; VINITKETKUMNEUN, U. 2004. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in J774.2 mouse macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, 95 (2-3): 183-189. DOI: 10.1016/j.jep.2004.06.019
- RODRIGO R.; GUICHARD C.; CHARLES R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundam Clin Pharmacol**. 2007 DOI: 10.1111/j.1472-8206.2006.00466.x
- SABELLA, D. Antidepressant Medications. **AJN, American Journal of Nursing**, v. 118, n. 9, p. 52–59, set. 2018. DOI: 10.1097/01.NAJ.0000544978.56301.f6
- 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, 26 dez. 2017. DOI: 10.1186/s12868-017-0357-0
- SILVA, F.T. Caracterização fitoquímica e atividades biológicas da *Centella asiatica* (L.) Urban / Frederico Pittella Silva; orientadora: profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa. – 2008. 150f. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/2913/1/fredericopitellasilvia.pdf> Acesso em: 10 de abril de 2024.
- SOUZA, M. M. R.; GODINHO, L. R. L. C. Atuação do Hypericum perforatum no tratamento da depressão. **Revista Terra e Cultura**, p. 51-65, Acesso em: 22 de novembro de 2023.
- SOUZA, M. S. F.; KOPITKE, L. Adesão ao tratamento com psicofármacos: Fatores de proteção e motivos de não adesão ao tratamento farmacológico. **Revista de APS**, v. 19, n. 3,

2016. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/aps/article/view/15497/8139> Acesso em 25 de abril de 2024.

TATSCH, E. et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 348–350, 1 mar. 2011. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.12.011

THOM, R.; SILBERSWEIG, D. A.; BOLAND, R. J. Major Depressive Disorder in Medical Illness: A Review of Assessment, Prevalence, and Treatment Options. **Psychosomatic Medicine**, v. 81, n. 3, p. 246–255, abr. 2019. DOI: 10.1097/PSY.0000000000000678

YANG, L. et al. The Effects of Psychological Stress on Depression. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 4, p. 494–504, jul. 2015. DOI: 10.2174/1570159x1304150831150507

WEI, Y.. et al. Maternal deprivation induces cytoskeletal alterations and depressive-like behavior in adult male rats by regulating the AKT/GSK3 β /CRMP2 signaling pathway. **Physiology & behavior**, v. 242, 12 jan. 2021. DOI: 10.1016/j.physbeh.2021.113625

WOLKOWITZ, O. M., et.al. Serum BDNF levels before treatment predict SSRI response in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1623–1630, ago. 2011. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2011.06.013

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mental health of older adults. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/mental-health-of-older-adults>. Acesso em: 11 de março de 2024.

ZHAO, Y.; et.al. Effect of Centella asiatica on Oxidative Stress and Lipid Metabolism in Hyperlipidemic Animal Models. **Oxid Med Cell Longev.**, 2014. DOI: 10.1155/2014/154295

APÊNDICE A - Protocolo de separação de sangue - PBMC - adaptado para murinos**SEPARAÇÃO DE PLASMA HEPARINA E PBMC (tampa verde)**

Materiais necessários (previamente organizados, separados e identificados):

- 1 tubos falcon de 15 mL por murino na primeira parte (ficoll) + 1 tubo falcon de 15 mL por murino na segunda etapa (nuvem); totalizando assim, 2 tubos para cada murino nesse processamento (OBS: usar uma caneta que não sai fácil os números nessa etapa)
 - Solução fisiológica (0,9%) - 20 ml x nº de amostras
 - o 4,5 g de cloreto de sódio
 - o 500 ml de água destilada
 - Ficoll - 3ml x nº de amostras
 - Tampão hemolítico (EDTA-CLORETO DE AMÔNIO) - 2ml x nº de amostras
 - o 4,15 g de cloreto de amônio;
 - o 0,50 g de bicarbonato de sódio;
 - o 0,02 g de EDTA dissódico;
 - o Dilua os sais em aproximadamente 400mL de água e depois de completamente dissolvido, acerte o volume para 500mL.
 - RPMI diluído com DMSO - 2ml x nº de amostras;
1. Centrifugar os tubos de heparina (tampa verde) a 3500 rpm por 5 min;
 2. Retirar o plasma HEP (parte superior) do tubo aliquotar em eppendorfs- 2 eppendorf por amostra;
 3. No tubo de tampa verde, irá ficar o restante do material biológico;
 4. Com esse material biológico que irá sobrar no tubo, deve-se colocar solução fisiológica na proporção 1:1 (então se há 5ml de sangue, deve-se colocar 5ml de solução fisiológica, totalizando 10 ml nesse tubo);
 5. Após o tubo estar com material biológico e solução fisiológica em proporção 1:1, deve-se homogeneizar delicadamente com uma pipeta de pasteur;
 6. Em um tubo seguinte, colocar 3 ml de Ficoll Hipaque. Sobre o Ficoll, com o tubo inclinado, adicione levemente pelas bordas do tubo, o sangue diluído com a solução fisiológica. Deve-se evitar a adição rápida da amostra;
 7. Centrifugar por 20 min a 1800 rpm;

8. Após a essa centrifugação haverá formação de uma nuvem, uma camada formada por células entre as camadas Ficoll e plasma. Essa nuvem contém as células PBMC e deve ser retirada com cuidado (de forma circular) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur;
9. Colocar essa nuvem em um último tubo falcon e adicionar solução fisiológica até os 10 ml, marcados no tubo falcon, homogeneizar, tampar o tubo e centrifugar por 5 minutos a 1800 rpm;
10. Descartar o sobrenadante por inversão. Os linfócitos vão estar no fundo do tubo, em forma de bolinha “pellet”;
11. Se tiver resto de sangue (vermelho no meio do branquinho) deve-se adicionar 2 ml de tampão hemolítico, homogeneizar e centrifugar a 1200 rpm por 10 min;
12. Descartar o sobrenadante por inversão. Acrescentar solução fisiológica até 5 ml marcados no falcon, homogeneizar e centrifugar a 1500 rpm por 5min (repetir esse processo mais de uma vez se necessário, até ficar bem limpo);
13. Após centrifugar, descartar o sobrenadante, adicionar 500 uL de meio RPMI diluído com DMSO (já preparado), homogeneizar e guardar no eppendorf (2 ml cada).

*Protocolo desenvolvido e adaptado pelo grupo de Pesquisa Cultivo Celular- UFFS Chapecó em conjunto com o Grupo NeuroTCE - UFFS Chapecó.