

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Elizete de Moraes Reis

**POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex*
paraguariensis EM ROEDORES: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
MONOAMINÉRGICO**

Santa Maria, RS
2017

Elizete de Moraes Reis

**POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis*
EM ROEDORES: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MONOAMINÉRGICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roselei Fachinetto
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Romaiiana Picada Pereira

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Reis, Elizete de Moraes

Potencial antidepressivo do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em roedores: envolvimento do sistema monoaminérgico / Elizete de Moraes Reis.- 2017.

72 p.; 30 cm

Orientadora: Roselei Fachinetto

Coorientadora: Romaiana Picada Pereira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2017

1. *Ilex paraguariensis* 2. Depressão 3. 3-iodo-L-tirosina 4. Éster metílico p-clorofenilalanina. Monoaminoxidase 5. Nado forçado. Suspensão da cauda I. Fachinetto, Roselei II. Pereira, Romaiana Picada III. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Elizete de Moraes Reis. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: elzreis@yahoo.com.br

Elizete de Moraes Reis

**POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis*
EM ROEDORES: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MONOAMINÉRGICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Aprovado em 31 de março de 2017:

Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Glaecir Roseni Mundstock Dias, Dra. (UFRJ)

Robson Luiz Puntel, Dr. (UNIPAMPA)

Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)

Marilise Escobar Bürger, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 31 de Março de 2017

AGRADECIMENTOS

À Deus;

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e à FAPERGS pela bolsa concedida;

Aos meus pais Nelson e Fátima Zeneida, pelo amor, carinho e compreensão e principalmente por vocês serem meus maiores exemplos e incentivadores;

À minha irmã Elis e sua família, em especial minhas sobrinhas Júlia e Luísa, pelo apoio e carinho.

Ao meu irmão Gabriel pelo carinho, pela companhia e palavras sinceras. Meu muito obrigada.

À minha orientadora, Roselei Fachineto, pela orientação e compreensão. Seus ensinamentos e conselhos foram essenciais para essa jornada. Obrigada por tudo.

À Romaiana Picada Pereira, co-orientadora desta tese, pela compreensão e auxílio nos momentos difíceis. Obrigada por tudo.

Aos meus colegas de laboratório: Catuscia e Bárbara por me auxiliarem em experimentos, pela companhia, pelas risadas e pelos carnavais; Ana Paula pelo apoio, disposição e organização; Getulio pela paciência e discussões; Janaína pela convivência, amizade e implicância; Alcindo e Luis pelo auxílio desde os primeiros experimentos; Caroline pela convivência, afeição e informações sobre o cardápio do RU; Jeane pela convivência, companhia e delicadeza; Larissa pelo bom humor, risadas e auxílio nos experimentos; Camila, Juliane e Talita pelo apreço apesar do pouco tempo de convivência. Vocês tornaram esse período de doutorado inesquecível na minha vida. Cada um teve um papel essencial e a cada um de vocês meu sincero muito obrigada.

As amigas, Caroline Leal e Fernanda Figueira, vocês fizeram parte dessa jornada, me apoiaram, me auxiliaram nos momentos difíceis e torceram pelo meu sucesso. Meu muito obrigada.

Aos meus familiares, obrigada pelo carinho, apoio e principalmente por torcerem pelo meu sucesso.

Aqueles que hoje não fazem mais parte do meu convívio, mas que mesmo assim contribuíram de alguma forma para que conclui-se esta etapa, minha gratidão.

RESUMO

POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis* EM ROEDORES: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MONOAMINÉRGICO

AUTOR: Elizete de Moraes Reis
ORIENTADORA: Roselei Fachinetto
CO-ORIENTADORA: Romaiana Picada Pereira

Ilex paraguariensis é uma planta amplamente consumida na América do Sul na forma de uma infusão conhecida como “chimarrão” ou “mate”, a qual apresenta efeitos relacionados à sua ação no sistema nervoso central. No entanto, pouco se sabe sobre sua ação no sistema monoaminérgico e possível efeito antidepressivo. Neste estudo, foi avaliado o potencial antidepressivo do extrato aquoso de *I. paraguariensis* em ratos e camundongos e investigada a participação do sistema monoaminérgico. No experimento 1, os ratos foram tratados com extrato aquoso de *I. paraguariensis* no lugar da água de beber, ad libitum, seguindo a preparação tradicional da bebida. Após 24 horas e 4 semanas de tratamento, foi realizada a análise comportamental através dos testes de campo aberto, nado forçado, labirinto em cruz elevado. *I. paraguariensis* diminuiu o tempo de imobilidade no teste de nado forçado após 24 horas (56%) e 4 semanas (28%) indicando um potencial efeito antidepressivo. Como controle positivo para este experimento, foi acrescentado um grupo experimental recebendo selegilina, o qual também apresentou redução no tempo de imobilidade no teste do nado forçado em torno de 56%. Não houve alterações atividade locomotora ou ansiogênica após 4 semanas de tratamento com *I. paraguariensis*. Ao final de 4 semanas de tratamento com a *I. paraguariensis*, foram avaliadas possíveis alterações oxidativas (peroxidação lipídica, níveis de vitamina C e níveis de tiol não proteico) e atividade da enzima monoaminoxidase no cérebro dos animais. Porém, não houve alterações significantes nestes parâmetros. No experimento 2, camundongos foram tratados com *I. paraguariensis* em diferentes concentrações (0,05; 0,1 e 0,2 g/mL) no lugar da água de beber durante 7 dias, ad libitum. Foram realizados os testes de nado forçado, suspensão da cauda e campo aberto após 24 horas de tratamento e 24 horas após o fim do período experimental. *I. paraguariensis* causou uma redução no tempo de imobilidade nos testes de nado forçado nas três concentrações testadas 0,05 g/mL (45%), 0,1 g/mL (48%) e 0,2 g/mL (41%) após 24 horas e 7 dias de tratamento (34%, 22% e 28%, respectivamente). No teste de suspensão da cauda, foi observada a redução do tempo de imobilidade nas concentrações de 0,05 g/mL (56%) e 0,1 g/mL (45%) após 24 horas. Nenhuma alteração foi observada na atividade locomotora dos animais. Para avaliar o envolvimento do sistema monoaminérgico, camundongos foram pré-tratados com 3-iodo-L-tirosina (inibidor da tirosina hidroxilase, 100 mg/Kg, i.p., 4 dias) ou éster metílico de p-clorofenilalanina (inibidor da triptofano hidroxilase, 100 mg/Kg, i.p., 4 dias) ou veículo. Após três dias de tratamento com os inibidores, os animais foram tratados com extrato aquoso de *I. paraguariensis* 0,05g/mL ou água e após 24 horas de tratamento foram realizados os testes do nado forçado e suspensão da cauda. O pré-tratamento com 3-iodo-L-tirosina preveniu a diminuição do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda, enquanto o pré- tratamento com p-clorofenilalanina metil éster preveniu a diminuição do tempo de imobilidade no teste de nado forçado, mostrando o envolvimento do sistema monoaminérgico na potencial atividade antidepressiva de *I. paraguariensis*.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*. Depressão. 3-iodo-L-tirosina. Éster metílico p-clorofenilalanina. Monoaminoxidase. Nado forçado. Suspensão da cauda.

ABSTRACT

ANTIDEPRESSANT POTENTIAL OF AQUEOUS EXTRACT OF *Ilex paraguariensis* IN RODENTS: INVOLVEMENT OF MONOAMINERGIC SYSTEM

AUTHOR: ELIZETE DE MORAES REIS
ADVISOR: ROSELEI FACHINETTO
COADVISOR: ROMAIANA PICADA PEREIRA

Ilex paraguariensis is a plant largely consumed in South America as an infusion known as “chimarrão” or “mate”, which shows effects related to its action in the central nervous system. However, little is known about its action on monoaminergic system and possible antidepressant effect. In this study, it was evaluated the possible antidepressant potential of aqueous extract of *I. paraguariensis* in rats and mice and it was investigated the participation of monoaminergic system. In experiment 1, rats were treated with an aqueous extract of *I. paraguariensis* in place of drinking water, *ad libitum*, following the traditional preparation of this beverage. After 24 hours and 4 weeks of treatment, it was carried out the behavioral analyze trough of open field, forced swimming and elevated plus maze test. *I. paraguariensis* reduced the immobility time on forced swimming test after 24 hours (56%) and 4 weeks (28%) indicating a potential antidepressant effect. As positive control to this experiment, it was added an experimental group receiving selegiline, which also presented a reduction in the immobility time on forced swimming test of about 56%. There are not alterations on the locomotor or anxiogenic activity after 4 weeks of treatment with *I. paraguariensis*. At the end of 4 weeks of treatment with *I. paraguariensis*, it was evaluated possible oxidative alterations (lipid peroxidation, vitamin C levels and non-protein thiol levels) and activity of the enzyme monoamine oxidase in the brain of the animals. However, there were no significant changes in these parameters. In the experiment 2, mice were treated with three different concentrations of *I. paraguariensis* (0.05; 0.1 e 0.2 g/mL) in place of drinking water during 7 days, *ad libitum*. It was performed the forced swimming, tail suspension and open field test after 24 hours of treatment and 24 hours after the end of experimental period. *I. paraguariensis* caused a decrease in the immobility time in forced swimming test at three concentrations tested 0,05 g/mL (45%), 0,1 g/mL (48%) e 0, 2 g/mL (41%) after 24 hours and 7 days of the treatment (34%, 22% e 28%, respectively). In the tail suspension test, it was observed a reduction in the immobility time in the concentrations of 0.05 g/mL (56%) and 0.1 g/mL (45%) after 24 hours. No changes were observed in locomotor activity of the animals. To evaluate the involvement of monoaminergic system, mice were pretreated with 3-iodo-L-tyrosine (inhibitor of tyrosine hydroxylase, 100 mg/Kg, i.p., 4 days) or p-chlorophenylalanine methyl ester (inhibitor of tryptophan hydroxylase, 100 mg/Kg, i.p., 4 days) or vehicle. After 3 days of treatment with inhibitors, the animals were treated with the extract aqueous of *I. paraguariensis* 0.05mg/mL or water and after 24 hours of the treatment, the forced swimming and tail suspension test were evaluated. The pretreatment with 3-iodo-L-tyrosine prevented the decrease in the immobility time in tail suspension test, whereas the pretreatment of mice with p-chlorophenylalanine methyl ester prevented the decrease in the immobility time in forced swimming test, demonstrating the involvement of the monoaminergic system in the potential antidepressant activity of *I. paraguariensis*.

key-words: *Ilex paraguariensis*. Depression. 3-iodo-L-tyrosine. p-chlorophenylalanine methylester. Monoamine oxidase. Forced Swimming Test. Tail Suspension Test.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1:** Biossíntese de dopamina..... 14
Figura 2: Biossíntese da 5-hidroxitriptamina..... 15

Artigo

- Figura 1:** Perfil representativo de *I. paraguariensis* por cromatografia líquida de alta eficiência..... 30
Figura 2: Efeito de *I. paraguariensis* no teste de campo aberto em ratos..... 31
Figura 3: Efeito de *I. paraguariensis* e selegilina no teste do nado forçado..... 31
Figura 4: Efeito de *I. paraguariensis* e selegilina na atividade da enzima monoaminoxidase 32

Manuscrito

- Figure 1:** Potencial inibitório *in vitro* de *I. paraguariensis* sobre a atividade da (A) MAO-A e (B) MAO-B em preparação de cérebro de camundongos 51
Figure 2: Efeito de *I. paraguariensis* no teste de campo aberto 52
Figure 3: Efeito de *I. paraguariensis* sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda (A) e nado forçado (B) 53
Figure 4: Efeito do pré-tratamento com 3-iodo-L-tirosina (A) e PCPA (B) sobre o efeito de *I. paraguariensis* no tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.... 54
Figure 5: Efeito do pré-tratamento com 3-iodo-L-tirosina (A) e PCPA (B) sobre o efeito de *I. paraguariensis* no tempo de imobilidade no teste de nado forçado. 55

Conclusão

- Figura 3:** Resumo esquemático 62

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1: Composição da infusão de <i>I. paraguariensis</i>	30
Tabela 2: Efeito de <i>I. paraguariensis</i> no labirinto em cruz elevado em ratos	30
Tabela 3: Efeito do tratamento com <i>I. paraguariensis</i> ou selegilina sobre parâmetros de estresse oxidativo.....	32

Manuscrito

Tabela 1: Efeitos de <i>I. paraguariensis</i> sob a atividade da MAO-A e MAO-B <i>ex vivo</i> em homogeneizado de cérebro.	56
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
AC	Adenilato ciclase
AD	Antidepressivo
ADT	Antidepressivos tricíclicos
AMPT	α -metil-p-tirosina
c-AMP	Adenosina monofosfato cíclico
COMT	Catecol-O-metiltransferase
DA	Dopamina
DAG	Diacil glicerol
DAT	Transportador de dopamina
DB	Depressão Bipolar
DOPA	3,4-diidroxifenilalanina
DU	Depressão unipolar
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
<i>H. perforatum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>
<i>I. paraguariensis</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>
IMAO	Inibidores da monoaminoxidase
INSRS	Inibidores não seletivos da recaptção de serotonina
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
LC	<i>Locus coeruleus</i>
MA	Monoaminas
MAO	Monoaminoxidase
NA	Noradrenalina
NET	Transportador de noradrenalina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCPA	Éster metílico p-clorofenilalanina
PKA	Proteína cinase A
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Trato gastrointestinal
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	SISTEMA MONOAMINÉRGICO	13
2.2	MONOAMINOXIDASE.....	17
2.3	DEPRESSÃO E TERAPIA FARMACOLÓGICA	18
2.4	DEPRESSÃO E TERAPIA COM PRODUTOS NATURAIS.....	20
2.5	<i>Ilex paraguariensis</i>	21
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	RESULTADOS	25
4.1	ARTIGO	26
4.1.1	Antidepressant-like effect of <i>Ilex paraguariensis</i> in rats	26
4.2	MANUSCRITO	36
4.2.1	Antidepressant-like effect of <i>Ilex paraguariensis</i> in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems	36
4.2.1.1	<i>Abstract</i>	38
4.2.1.2	<i>Introduction</i>	39
4.2.1.3	<i>Materials and Methods</i>	40
4.2.1.4	<i>Results</i>	43
4.2.1.5	<i>Discussion</i>	45
4.2.1.6	<i>References</i>	47
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	ANEXO A- APROVAÇÕES DO COMITÊ DE ÉTICA	71

1 INTRODUÇÃO

A depressão é uma doença psiquiátrica que afeta cerca de 300 milhões de pessoas mundialmente. Segundo a Organização mundial da Saúde (OMS), no Brasil estima-se que esta doença afete 5,8% da população (WHO, 2017). Muitas hipóteses têm sido estudadas para explicar a etiologia da depressão sendo a hipótese das monoaminas (MA) a mais aceita, uma vez que os fármacos utilizados para depressão modulam a neurotransmissão de serotonina (5-HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NA) (BERTON; NESTLER, 2006; KÖHLER et al., 2016). As principais classes de fármacos antidepressivos utilizados clinicamente são: inibidores seletivos da recaptação de 5-HT e inibidores não seletivos da recaptação de 5-HT, DA e NA, inibidores da monoaminoxidase (IMAO), antidepressivos tricíclicos (ADT) e antidepressivos atípicos (BELMAKER; AGAM, 2008).

Apesar do grande avanço na terapia antidepressiva, os antidepressivos (AD) sintéticos apresentam consideráveis efeitos indesejáveis, afetando a qualidade de vida do paciente e a adesão ao tratamento. Além disso, alguns trabalhos demonstram que apenas 66% dos pacientes respondem às terapias existentes na atualidade (MILLAN, 2006). Desta forma, a busca por tratamentos alternativos, que possam agir como adjuvantes na terapia antidepressiva, como a utilização de plantas medicinais, tem ganhado atenção na literatura por possuir algumas vantagens como: apresentar menores efeitos indesejáveis, além de boa aceitação e adesão ao tratamento por parte do paciente (BELMAKER; AGAM, 2008). Como alternativa aos antidepressivos sintéticos, a utilização de plantas medicinais tem obtido um relativo sucesso em casos de depressão leve a moderada (MAHER et al., 2016). Como exemplo pode-se citar o *Hypericum perforatum*, popularmente conhecido como Erva-de-São-João. O *H. perforatum* é utilizado para tratar formas leves e moderadas de depressão e tem seu mecanismo de ação atribuído à inibição da recaptação de 5-HT e a inibição da monoaminoxidase (BUTTERWECK, 2003; SUZUKI et al., 1984).

Neste contexto, *I. paraguariensis*, conhecida como erva-mate, é uma planta nativa da América do Sul amplamente consumida sob a forma de uma bebida tradicional no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina. *I. paraguariensis* possui vários compostos bioativos entre eles: polifenóis, metilxantinas, taninos, vitaminas e saponinas. Além disso, *I. paraguariensis* apresenta propriedades antioxidantes, vasodilatadoras, redutora de lipídeos e peso entre outras (BASTOS et al., 2007). Dados da literatura já demonstraram que a *I. paraguariensis* exerce ação no sistema nervoso central (SNC) (BRANCO et al., 2013; COLPO et al., 2007; PREDIGER et al., 2008). Além disso, compostos presentes na *I. paraguariensis*, como

flavonoides, contribuem de forma significativa para atividade antidepressiva do *H. perforatum* (BUTTERWECK et al., 2003a) e já tem sua atividade antidepressiva comprovada isoladamente, como é o caso da rutina (MACHADO et al., 2008). Através deste estudo avaliou-se o potencial antidepressivo do extrato aquoso de *I. paraguariensis* e, além disso, verificou-se, *in vivo* e *in vitro*, alguns dos possíveis mecanismos pelos quais essa planta exerce seu efeito.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

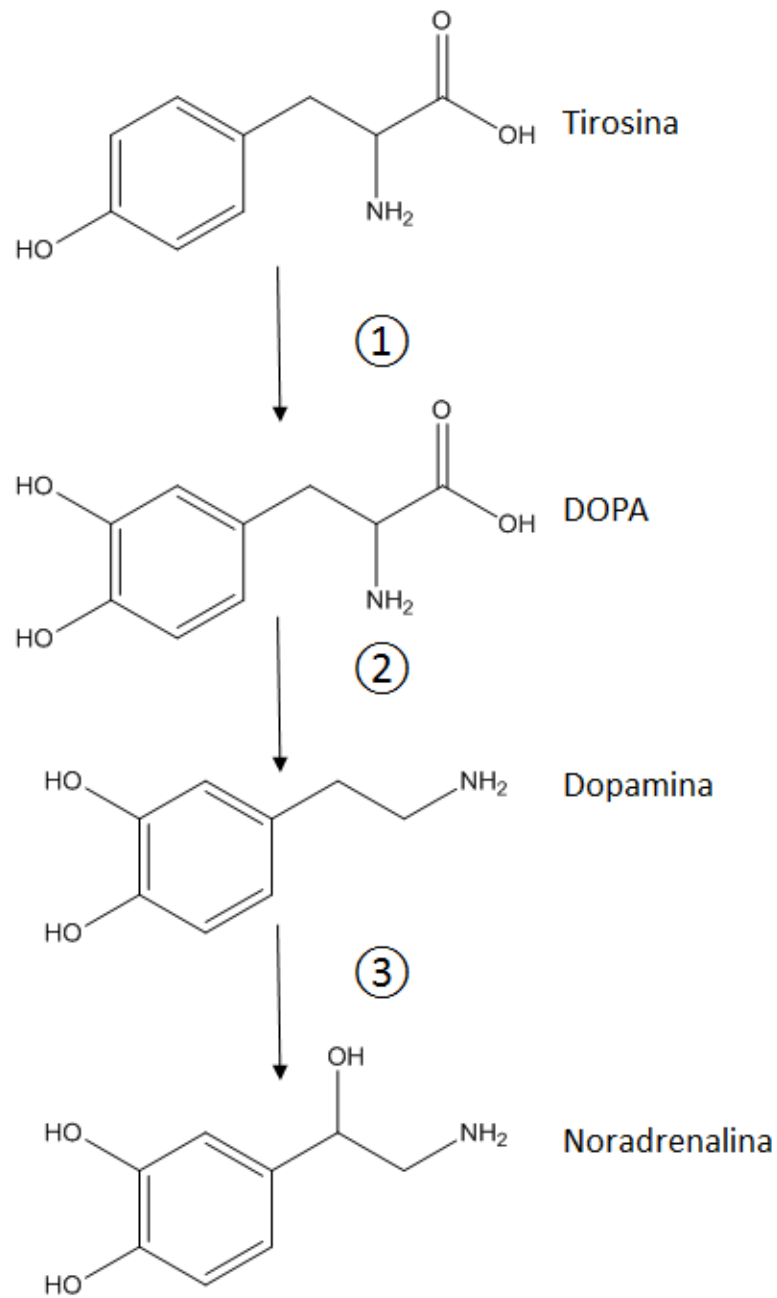
2.1 SISTEMA MONOAMINÉRGICO

O sistema monoaminérgico tem como principais neurotransmissores a DA, a NA e a 5-HT. Estes neurotransmissores estão envolvidos em praticamente todas as funções cerebrais de maneira que, modificações na atividade deste sistema têm sido associadas a doenças neurológicas e neuropsiquiátricas (DI GIOVANNI et al., 2016). As vias monoaminérgicas projetam-se a partir do tronco encefálico para áreas cerebrais e da medula espinhal e elas incluem neurônios dopaminérgicos localizados na região tegmental ventral e *substantia nigra pars compacta*, neurônios adrenérgicos provenientes do *locus coeruleus* (LC) e neurônios serotoninérgicos originados dos núcleos mediano e dorsal da *rafe* (HALE; LOWRY, 2011).

A DA e a NA são conhecidas como catecolaminas. Essas MA compartilham a mesma via de síntese. Elas são sintetizadas a partir da conversão do mesmo precursor, o aminoácido tirosina, pela enzima tirosina hidroxilase (enzima regulatória da síntese) a 3,4-dihidrofenilalanina (DOPA), a qual, então é convertida à DA que por sua vez é convertida à NA (Figura 1) (IVERSON, 1991). A 5-HT, é sintetizada a partir da conversão do aminoácido triptofano a 5-hidroxitriptofano (etapa limitante da síntese) e em seguida a 5-HT (Figura 2) (FULLER, 1980).

Após sua síntese, as MA, são concentradas em vesículas nos terminais nervosos pré-sinápticos através da ação de um transportador vesicular de MA (VMAT) (NJUS et al., 1986). Em humanos, o VMAT₁ e o VMAT₂, foram isolados com sucesso através de técnicas de clonagem. O VMAT₁ está presente em células de órgãos periféricos enquanto, o VMAT₂ é o transportador vesicular de MA predominante no SNC (MASSON et al., 1999). O acúmulo vesicular de MA confere a estas moléculas proteção contra vazamento e/ou metabolismo intraneural (MASSON et al., 1999). Quando o potencial de ação atinge os terminais nervosos, a despolarização da membrana neuronal leva a abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente presentes na mesma. A consequente entrada de Ca²⁺ promove a fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica e liberação das MA (RANG; DALE, 2007). Uma vez liberadas, as MA propagam o impulso nervoso em diferentes vias cerebrais através da interação com seus respectivos receptores.

Figura 1 – Biossíntese de dopamina e noradrenalina



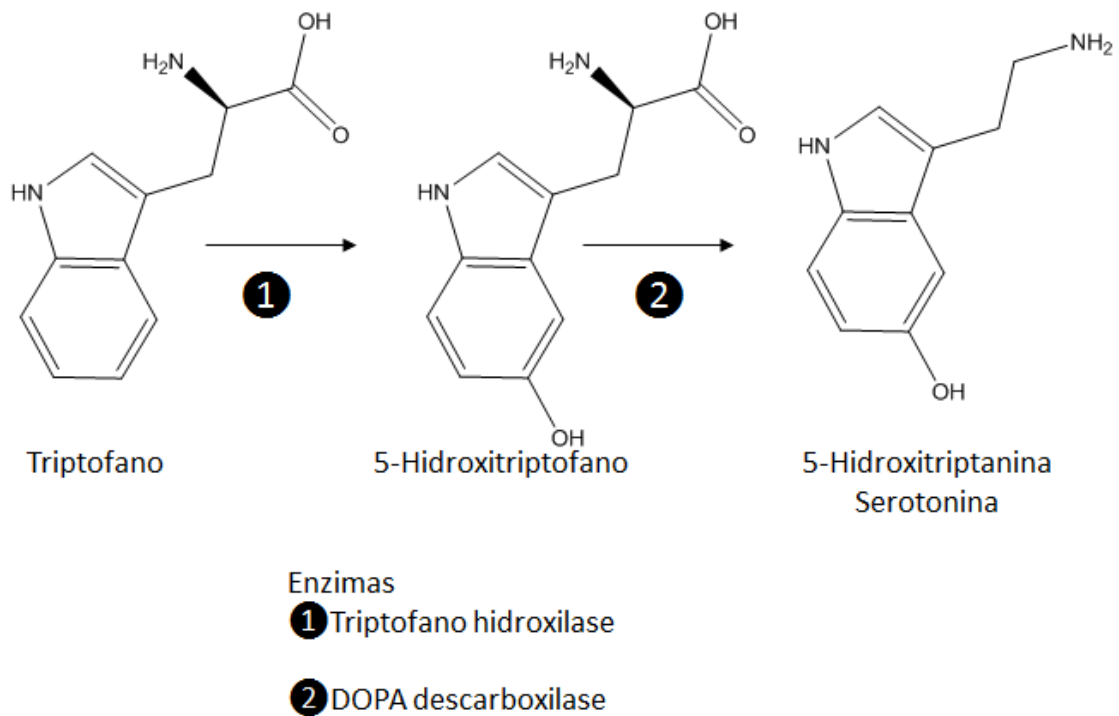
Enzimas

① Tirosina hidroxilase

② DOPA descarboxilase

③ Dopamina β hidroxilase

Figura 2 – Biossíntese da 5-hidroxitriptamina



Fonte: Baseada em Golan (2009, p. 188).

Em sua maioria, os receptores do sistema monoaminérgico são acoplados a proteína heteromérica ligada ao nucleotídeo guanosina, também chamada de proteína G. A ligação de um agonista ao seu receptor altera o estado de conformação e promove a troca de guanosina difostato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP). Esta ativação específica da proteína G irá regular positivamente ou negativamente enzimas e canais iônicos (NEER, 1995; OFFERMANN, 2003). A proteína G_s estimula a ativação da enzima adenilato ciclase (AC) resultando na produção do segundo mensageiro adenosina monofostato cíclico (AMPC) e consequente ativação da proteína cinase A (PKA) dependente de AMPC. A ativação da PKA, por sua vez, causa a fosforilação de várias proteínas celulares produzindo respostas específicas. A proteína G de natureza excitatória, está relacionada à ativação da enzima fosfolipase C pela ativação da proteína G_q , levando a formação dos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5- trifosfato (IP_3) (BARABAN; AGHAJANIAN, 1980). Por outro lado, a proteína G_i , cuja ativação inibe a produção de AMPC, de natureza inibitória, medeia a hiperpolarização da membrana neural através do aumento da condutância ao K^+ pela ligação do agonista a proteína G reguladora de canais de K^+ (LIGGETT, 1996).

As respostas adrenérgicas e seus receptores são classificados em duas categorias gerais: receptores alfa (α), subdivididos em alfa 1 (α_{1a} , α_{1b} e α_{1d}) e alfa 2 (α_{2a} , α_{2b} e α_{2c}) e beta

(β) que são divididos em três subtipos (β_1 , β_2 e β_3) (AHLES; ENGELHARDT, 2014; KELTNER et al., 2001). Os receptores β são acoplados a proteína Gs. Por outro lado, os receptores α_1 são acoplados a proteína G_q . Enquanto os receptores α_2 são acoplados a proteína G_i . Uma importante função dos receptores α_2 é a regulação pré-sináptica da liberação de neurotransmissores, sendo implicado no controle inibitório de vias adrenérgicas e serotoninérgicas que inervam o córtex frontal (DENNIS et al., 1987; LIMBERGER et al., 1986).

O sistema serotoninérgico tem como principal neurotransmissor a 5-HT. A 5-HT foi detectada no cérebro em meados da década de 50 e desde então, sabe-se de seu envolvimento na fisiopatologia de vários distúrbios do sistema nervoso, dentre eles a depressão (ELHWUEGI, 2004). Em mamíferos, pelo menos 14 subtipos de receptores de serotonina foram identificados. Os receptores do subtipo 5-HT₁ são subdivididos, em pelo menos, 5 (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}). A ativação destes receptores está ligada à inibição da atividade da AC através da proteína G_i , inibindo a formação do segundo mensageiro AMPc ou regulando canais de Ca^{2+} e K^+ (BEER et al., 1993). Os receptores 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2c}) ativam a proteína G_q , ativando a fosfolipase C (FINK; GÖHERT, 2007). O receptor 5-HT₃ é um receptor ligado a canal iônico que medeia uma rápida despolarização da membrana neural. Por outro lado, os receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ são receptores acoplados positivamente a AC, aumentando os níveis de AMPc (CIRANNA, 2006).

A DA, por sua vez, é um importante neurotransmissor envolvido em diversas funções vitais incluindo movimento, afeto, recompensa, sono, atenção, memória e aprendizado (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). As ações fisiológicas da DA são mediadas por 5 receptores, divididos em duas grandes classes: receptores D1, a qual compreende os receptores do tipo D₁ e D₅ e receptores D2, que inclui os receptores D₂, D₃ e D₄ (ANDERSEN et al., 1990). A ligação da DA aos receptores da classe D1 promove a ativação da proteína Gs, que conseqüentemente estimula a produção de AMPc pela AC. Os receptores da classe D2 estão associados a proteína G_i , a ativação desta classe de receptores promove a inibição da AC (SOKOLOFF et al., 2006).

As ações de todas as MA são terminadas de forma ativa através da recaptação da fenda sináptica para neurônio pré-sináptico e/ou células gliais, sendo o transportador de 5-HT (SERT), o transportador de DA (DAT) e o transportador de NA (NET) responsáveis pela captação de 5-HT, DA e NA respectivamente (TORRES et al., 2003). Outros transportadores de baixa afinidade/alta capacidade também podem recaptar MA como os transportadores orgânicos de cátions (subtipos 1-3) e transportadores de MA da membrana plasmática

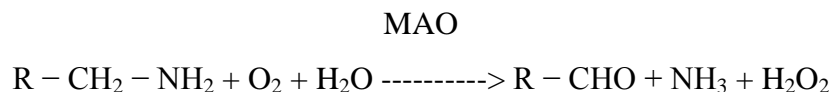
(PMAT), os quais são expressos em células gliais e outros tipos de neurônios que estão envolvidos na recaptação de histamina e outras MA (DAWS, 2009).

A degradação das aminas biogênicas envolve enzimas como a monoaminoxidase (MAO) e a catecol-O-metiltransferase (COMT). A COMT pode metabolizar DA e NA, duas isoformas têm sido descritas, uma forma solúvel (S-COMT) e outra ligada à membrana (MB-COMT). No cérebro, a S-COMT é encontrada em células gliais e inativa preferencialmente catecolaminas exógenas enquanto, a MB-COMT está ligada ao retículo endoplasmático e presente nos neurônios inativando catecolaminas e seus derivados (EISENHOFER et al., 2004; MYÖHÄNEN et al., 2010). Por outro lado, a enzima MAO degrada aminas primárias, secundárias e terciárias (YOUUDIM; BAKHLE, 2006).

2.2 MONOAMINOXIDASE

A MAO, EC 1.4.3.4, é uma enzima mitocondrial amplamente distribuída com altos níveis de expressão no trato gastrointestinal (TGI), em órgãos como o fígado e também em neurônios. Esta enzima é responsável pela desaminação oxidativa das aminas biogênicas, como por exemplo, 5-HT, NA e DA (FINBERG; RABEY, 2016), controlando os níveis destas nas células. Além de oxidar neurotransmissores, esta enzima inativa aminas ingeridas impedindo a ação das mesmas como falsos neurotransmissores (EDMONSON et al., 2007). A tiramina e outras aminas simpaticomiméticas, presentes em alimentos e bebidas, são também inativadas pela MAO. A inativação das aminas exógenas possui grande importância fisiológica pois quando essas aminas exógenas acessam o sistema circulatório ocorre liberação de NA e um conseqüente aumento da pressão arterial (YOUUDIM; WEINSTOCK, 2004).

A reação catalisada pela MAO pode ser representada pela seguinte equação geral:



O aldeído (R – CHO) formado juntamente com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO's), as quais são normalmente metabolizadas por enzimas como a catalase e a superóxido dismutase. Uma disfunção no sistema enzimático de defesa antioxidante pode tornar a ação da MAO neurotóxica, sendo considerada um fator

importante em doenças neurodegenerativas, uma vez que o estresse oxidativo tem sido considerado uma das principais causas de doenças, como a Doença de Parkinson (ALUF et al., 2011; JENNER, 2003).

A ideia da existência de mais de uma forma da enzima MAO foi fortalecida quando o inibidor clorgilina foi utilizado para diferenciar as duas isoformas em tecidos humanos e animais, as quais foram denominadas por Johnson (1968) como tipo A e tipo B. A MAO-A é inibida por baixas concentrações de clorgilina e desamina preferencialmente a 5-HT, enquanto que a MAO-B é inibida por baixas concentrações de selegilina e desamina a β -feniletilamina e a benzilamina. A DA, a NA e a tiramina são oxidadas por ambas as isoformas da MAO na maioria das espécies (YOU DIM; BAKHLE, 2006).

Técnicas de imuno-histoquímica e cultura de células demonstraram que a MAO-A é encontrada predominantemente em regiões cerebrais como LC, *substantia nigra* e regiões periventriculares do hipotálamo, ou seja, regiões com alta densidade de neurônios adrenérgicos e dopaminérgicos. Por outro lado, a MAO-B tem expressão preferencial em neurônios serotoninérgicos (células do núcleo dorsal da *rafe*) e em astrócitos. Contudo, a exata localização das duas isoformas da MAO no SNC ainda não está completamente elucidada (FINBERG; RABEY, 2016; WESTLUND et al., 1985).

Devido à sua função no metabolismo dos neurotransmissores 5-HT, NA e DA, a MAO parece exercer um papel importante na fisiopatologia de diversos distúrbios neurológicos, uma vez que sua inibição é alvo no tratamento de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, tais como Doença de Parkinson e depressão.

2.3 DEPRESSÃO E TERAPIA FARMACOLÓGICA

Sendo um dos distúrbios psiquiátricos mais prevalentes, a depressão tem sido projetada como causa de incapacidade mundial, afetando mais mulheres do que homens (CRAMER et al., 2017; MOUSSAVI et al., 2007). Segundo a OMS, a depressão afeta cerca de 300 milhões de pessoas mundialmente (WHO, 2017). Este distúrbio de humor é, em geral, classificado em dois tipos, que são a depressão unipolar (DU), na qual as oscilações de humor são sempre na mesma direção, e a depressão bipolar (DB), na qual a depressão se alterna com a mania (BRUNTON et al., 2012). A DU pode apresentar manifestações leves como a distímia, definida como uma condição leve e crônica com duração de pelo menos dois anos, e formas mais graves, como a depressão maior, associada a prejuízos na funcionalidade e altas taxas de hospitalização (VON WOLFF et al., 2012). A DB é caracterizada por episódios

recorrentes maníacos, mistos e depressivos, com estimativa global de 1-5%, seu diagnóstico tem critérios diferentes de outras doenças psiquiátricas, como depressão maior, esquizofrenia e outras (KURITA, 2016).

Com um grande impacto psicológico para o paciente, o diagnóstico da depressão é feito através da observação de mudanças psicofisiológicas que afetam consideravelmente a vida pessoal e profissional por um longo período de tempo. Alterações de humor, como tristeza profunda ou irritabilidade, acompanhadas por modificações no sono, apetite ou desejo sexual, perda da vontade de realizar atividades antes consideradas prazerosas (anedonia), fadiga ou falta de energia são os sintomas mais observados para o diagnóstico (BELMAKER; AGAM, 2008). Além disso, a depressão possui uma alta taxa de comorbidade relacionada a outras condições crônicas como adicção, doenças neurodegenerativas e outras doenças psiquiátricas (CRAMER et al., 2017).

Apesar do aumento do conhecimento científico em relação aos distúrbios depressivos, os mecanismos biológicos e subjacentes para desenvolvimento dos mesmos ainda não estão bem estabelecidos. Várias hipóteses são propostas entre elas hiperatividade no eixo neuroendócrino (BINDER; NEMEROFF, 2010), prejuízos na plasticidade celular em particular na neurogênese hipocampal (KEMPERMANN; KRONENBERG, 2003), alterações na sinalização de neurotrofinas (VOLETI; DUMAN, 2012), neuroinflamação (MAES, 2008; KRONENBERG et al., 2014) e dano oxidativo (KHANZODE et al., 2003).

A descoberta dos primeiros AD nos anos de 1950, ipronazida e imipramina, relacionaram fortemente a neurotransmissão monoaminérgica na etiopatologia dos distúrbios efetivos, dando origem a hipótese das MA para a depressão. A iproniazida foi o primeiro IMAO, inicialmente desenvolvido como um fármaco antituberculose e a imipramina, o primeiro ADT o qual foi lançado no mercado como um antipsicótico (KÖHLER et al., 2016). O IMAO aumenta a disponibilidade pré-sináptica de neurotransmissores, devido à falta de inativação destes enquanto, o ADT inibe, de forma não seletiva, os transportadores responsáveis pela recaptção de neurotransmissores (NEMEROFF; OWENS, 2002). Estas descobertas facilitaram o desenvolvimento de novos AD, os inibidores seletivos da recaptção de 5-HT (ISRSs) foram lançados nos anos de 1980, sendo a fluoxetina o primeiro desta classe, e logo superaram os ADT (KÖHLER et al., 2016). A fluoxetina inibe de forma não muito seletiva o SERT, o enquanto citalopram, escitalopram, fluvoxamina, paroxetina ou sertralina são mais seletivos (DI GIOVANNI et al., 2016).

Mesmo com grandes avanços na terapia antidepressiva, alguns fatores limitantes são associados ao tratamento com AD, pode-se citar o intervalo de algumas semanas para

observação da melhora dos sintomas (KRONENBERG et al., 2014). Além disso, nos últimos 20 anos tem se observado uma grande proporção de pacientes que não apresentam resposta ao tratamento ou apresentam uma resposta parcial levando à introdução de ADs novos e mais eficazes. Inibidores não seletivos da recaptção de 5-HT (INSRs), como a venlafaxina, inibem a recaptção de NA e 5-HT e apresentaram uma melhor eficácia que os ISRSs, inibidores não seletivos da recaptção de 5-HT, a duloxetine e inibidores seletivos da recaptção de NA, a reboxetina (DI GIOVANNI et al., 2016). Os ADT têm efeitos adversos, os quais incluem boca seca, visão embaçada, constipação e retenção urinária, já os inibidores seletivos e não seletivos da recaptção de MA apresentam efeitos adversos como náuseas, anorexia, insônia e perda da libido (RANG; DALE, 2007).

Assim, a medicina natural tem sido utilizada para auxiliar no tratamento da depressão na busca de novas opções terapêuticas e efeitos colaterais menos significativos.

2.4 DEPRESSÃO E TERAPIA COM PRODUTOS NATURAIS

O *H. Perforatum* por exemplo, é uma planta popularmente utilizada para tratamento de diferentes formas de depressão, sendo mais utilizada em casos leves a moderados (MAHER et al., 2016). Estudos visando esclarecer os mecanismos de ação desta planta atribuíram à inibição da enzima MAO e da recaptção de monoaminas sua atividade antidepressiva. *H. perforatum* possui uma gama de compostos e sua atividade antidepressiva relacionada a compostos como hipericina e hiperforina. Dados da literatura, demonstram que extratos desta planta, mesmo sem a presença de hipericina e hiperforina mas, ricos em flavonoides apresentam atividade antidepressiva. (SUZUKI et al., 1984; BUTTERWECK, 2003). Apesar de bem tolerados, os extratos de *H. perforatum*, ainda assim apresentaram efeitos adversos como náuseas, erupções cutâneas, fadiga, inquietação e fotossensibilidade. Mas a grande desvantagem encontrada nessa planta são interações medicamentosas com uma gama de medicamentos, como por exemplo AD, hipoglicemiantes e contraceptivos orais (RUSSO et al., 2014).

Em estudo realizado por Machado et al. (2008) foi demonstrada a atividade antidepressiva da rutina, um flavonóide, em camundongos tratados com diferentes doses (0,3-10 mg/Kg) por via oral. Neste mesmo estudo foi relacionada a participação do sistema monoaminérgico na atividade antidepressiva da rutina. Outro polifenol que vem sendo estudado devido ao seu potencial antidepressivo é o resveratrol, encontrado em cascas de uvas e vinhos tintos, este composto já teve sua atividade antidepressiva demonstrada em

camundongos tratados com diferentes doses (20-80 mg/Kg, por via oral) (ALI et al., 2015; WANG et al., 2013). O aumento dos níveis de neurotrofinas em diferentes regiões cerebrais e a inibição da MAO, têm sido alguns dos mecanismos atribuídos a atividade antidepressiva do resveratrol (ALI et al., 2015; WANG et al., 2013; NABAVI et al., 2015).

Muitos compostos naturais apresentam uma série de atividades biológicas bem descritas, estes compostos apresentam um fácil acesso, uma vez que podem ser encontrados em diversos alimentos que fazem parte da rotina da população. Neste contexto, torna-se importante a busca por novas atividades biológicas de compostos naturais, de maneira que o consumo destes compostos possa ser uma alternativa para auxiliar o tratamento de diversas doenças, incluindo a depressão.

2.5 *Ilex paraguariensis*

I. paraguariensis, também conhecida como erva-mate, é uma árvore pertencente à família *Aquifoliaceae*. Nativa da América do Sul, o consumo de erva-mate foi adotado para preparação de bebidas estimulantes e por suas propriedades medicinais, a partir de habitantes nativos (Guaranis) de uma região que compreende Paraguai, Uruguai, nordeste da Argentina e o sul do Brasil. No século XVII, a colonização jesuítica promoveu o cultivo de erva-mate como forma de comércio, facilitando a disseminação de seu consumo (BRACESCO et al., 2011).

A infusão preparada das folhas de *I. paraguariensis* secas e processadas é chamada de “chimarrão” ou “mate”. O preparo da bebida se dá pela compactação da erva-mate lateralmente em um recipiente denominado “cuia”. Água quente, mas não em ebulição, é adicionada cuidadosamente para não afetar o conteúdo de erva-mate previamente acomodado. Então a infusão é bebida através de um tubo metálico chamado “bomba”, o qual possui uma espécie de filtro na extremidade em contato com a infusão (MAZZAFERA, 1997).

O chimarrão tem um papel social importante e o ato de ofertá-lo tem conotação semelhante à cerimônia do chá em algumas culturas orientais. A Argentina é o primeiro exportador, enquanto o Uruguai tem o maior consumo *per capita*, 6-8 Kg/pessoa/ano. No Brasil, apenas 3 estados são consumidores de chimarrão, são eles Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (BRACESCO et al., 2011).

Na última década, a erva-mate ganhou destaque por seu consumo não tradicional, além da fabricação de bebidas mate, tem sido utilizada para produção de cervejas, cremes, doces entre outros. Curiosamente, a comercialização de bebidas energéticas a base de erva-mate tem

se espalhado de maneira global, podendo ser encontradas em supermercados na Califórnia, nos Estados Unidos e na Europa em combinação com outras ervas, na forma de um chá energético ou no tratamento auxiliar da perda de peso (BRACESCO et al., 2011).

Extratos das folhas de *I. paraguariensis* (não torradas) contêm alcaloides purínicos (metilxantinas), vitaminas, taninos, ácido clorogênico e seus derivados, saponinas triterpênicas derivadas do ácido ursólico (BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007; MARTINET et al., 2001; MENINI et al., 2007). Embora a presença de metilxantinas seja responsável por muitas atividades farmacológicas atribuídas a erva-mate, outras propriedades foram encontradas independentemente da presença destes compostos (GUGLIUCCI et al., 2009a, b).

Os extratos de *I. paraguariensis* são especialmente ricos em ácido clorogênico. Os ácidos clorogênicos são uma grande família de ésteres formados por certos ácidos hidroxinâmicos e ácido quínico. Este último, junto ao ácido cafeíco forma um éster chamado ácido clorogênico, que é um polifenol, junto com rutina, quercetina, catequina entre outros. Café, frutas cítricas e girassol são exemplos de fontes deste ácido. São extraídos da erva-mate quantidades superiores de polifenóis comparadas ao chá verde e paralelas aos vinhos tintos (GUGLIUCCI et al., 2009a, b). A erva-mate contém saponinas que são conhecidas por ligarem-se aos sais biliares impedindo a absorção de lipídeos no TGI (BASTOS et al., 2007; GNOATTO, 2008). Folhas de *I. paraguariensis* na forma torrada são especialmente consumidas nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, esta forma mantém os mesmos componentes, porém com adição de melanoidinas, ou seja, produtos da reação entre aminoácidos e açúcares que combinam-se em altas temperaturas (BASTOS et al., 2007).

Nos últimos anos, houve um aumento de dados da literatura sobre os efeitos da *I. paraguariensis*. *I. paraguariensis* tem propriedades antioxidantes bem documentadas (BRADESCO et al., 2011; BRANCO et al., 2013). Estudos demonstraram que extratos de *I. paraguariensis* reduziram os níveis de colesterol e lesões aórticas em coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol (LEE, 2007; MOSIMANN et al., 2006). Em humanos, o consumo de chimarrão demonstrou uma melhora nos níveis séricos de lipídeos em indivíduos com dislipidemias (DE MORAIS et al., 2009). Outra propriedade atribuída à erva-mate é a redução de peso (ANDERSEN; FOGH, 2001; DICKEL, 2007; PITTLER et al., 2005). Em modelo de cultura de células, *I. paraguariensis* mostrou um efeito antimutagênico e protetor do DNA (BRACESCO et al., 2003; MIRANDA et al., 2008). Estudos epidemiológicos associam o consumo de erva-mate ao câncer de orofaringe (LORIA et al., 2009; PINTOS et al., 1994; SEWRAM et al., 2003), porém esse efeito está mais relacionado com a

temperatura da infusão do chimarrão e outros fatores, como por exemplo tabagismo (RAMIREZ-MARES et al., 2004).

Já foram descritos efeitos de diferentes extratos de *I. paraguariensis* no SNC (BRANCO et al., 2013; COLPO et al., 2007; LUDKA et al., 2017; PREDIGER, et al., 2008). Ratos tratados de forma aguda com extrato hidroalcoólico de *I. paraguariensis* apresentaram uma melhora de cognição possivelmente devido à sua ação em receptores de adenosina (PREDIGER et al., 2008). Por outro lado, ratos tratados com haloperidol que receberam o extrato aquoso de *I. paraguariensis* durante 60 dias, demonstraram melhora nos prejuízos de memória, esta melhora foi atribuída a modulação indireta no estresse oxidativo (COLPO et al., 2007). O extrato liofilizado de *I. paraguariensis* na dose de 50 mg/kg durante 15 dias apresentou efeito anticonvulsivante e neuroprotetor em ratos tratados com pentilenotetrazol, devido a redução do dano oxidativo em proteínas e lipídios (BRANCO et al., 2013). Considerando que a *I. paraguariensis* tem sido foco de diversos estudos e possui diversas propriedades bem descritas, incluindo efeitos no SNC, torna-se válida a busca por novas ações desta planta, como a atividade antidepressiva, bem como os mecanismos envolvidos nestas atividades.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a potencial atividade antidepressiva do extrato aquoso de *I. paraguariensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do extrato aquoso de *I. paraguariensis* sobre parâmetros comportamentais, teste de campo aberto, labirinto em cruz elevado e nado forçado e bioquímicos, status oxidativo e atividade da MAO, em ratos;
- Avaliar a participação do sistema monoaminérgico na potencial atividade antidepressiva do extrato aquoso de *I. paraguariensis* em camundongos;
- Avaliar a influência de *I. paraguariensis* sobre a atividade da MAO *in vitro* e *ex vivo* em camundongos.

4 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de um artigo, aceito para publicação na revista **BIOMED RESEARCH INTERNACIONAL-PHARMACOLOGY** e um manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e manuscrito, e representam a íntegra deste estudo.

4.1 ARTIGO

4.1.1 Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in rats

Periódico: Biomed Research Internacional- Pharmacology

Autores: Elizete De Moraes Reis, Francisco Waldomiro Schreiner Neto, Vitória Berg Cattani, Luis Ricardo Peroza, Alcindo Busanello, Caroline Queiroz Leal, Aline Boligon, Tássia Lehmen, Milena Libardoni, Margareth Linde Athayde, Roselei Fachinetto

Research Article

Antidepressant-Like Effect of *Ilex paraguariensis* in Rats

Elizete De Moraes Reis,¹ Francisco Waldomiro Schreiner Neto,²
 Vitória Berg Cattani,² Luis Ricardo Peroza,³ Alcindo Busanello,¹ Caroline Queiroz Leal,⁴
 Aline Augusti Boligon,⁵ Tássia Fontana Lehmen,⁴ Milena Libardoni,⁴
 Margareth Linde Athayde,⁵ and Roselei Fachinetto^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

² Curso de Farmácia, Universidade de Cruz Alta, 98020-290 Cruz Alta, RS, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/Bioquímica Toxicológica, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

⁵ Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Elizete De Moraes Reis; elzmreis@gmail.com and Roselei Fachinetto; roseleirf@gmail.com

Received 4 November 2013; Revised 31 January 2014; Accepted 25 March 2014; Published 4 May 2014

Academic Editor: Adair Santos

Copyright © 2014 Elizete De Moraes Reis et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In this study, we investigated the possible antidepressant-like effect of *I. paraguariensis* in rats. Rats were treated for four weeks with an aqueous extract of *I. paraguariensis* in drinking water, following the traditional preparation of this beverage. After the period of treatment, behavioral (elevated plus-maze, open field test, and forced swimming test) and biochemical parameters (lipid peroxidation assay, thiol content, vitamin C levels, and monoamine oxidase activity) were evaluated. Animals were also analyzed on forced swimming test after 24 hours of *I. paraguariensis* intake. An additional group was injected with selegiline 24 hours and 30 minutes before forced swimming test as positive control. HPLC analysis revealed the profile of *I. paraguariensis* extract. *I. paraguariensis* reduced the immobility time on forced swimming test without significant changes in locomotor activity in the open field test. Any anxiolytic/angiogenic effect of *I. paraguariensis* was observed in rats through the elevated plus-maze test. The antidepressant-like effect of *I. paraguariensis* was not accompanied by inhibitory effect on monoamine oxidase activity. There were no significant alterations on lipid peroxidation, thiol content, and vitamin C levels among the groups. In conclusion, aqueous extract of *I. paraguariensis* decreases the time of immobility in rats suggesting an antidepressant-like effect.

1. Introduction

Depression is a psychiatric illness with a high prevalence in humans reaching 21% of the worldwide population [1]. It is well known that pathophysiology of depression involves a dysfunction in monoamine neurotransmitter circuits in the central nervous system [2]. The treatments of depression have monoamines, their receptors and transporters as a target [2]. There are several classes of synthetic drugs available for treating depression in humans: tricyclics, monoamine oxidase inhibitors, selective serotonin reuptake inhibitors, and atypical antidepressants as mirtazapine, for example [3]. However, even the more recent synthetic antidepressants, like atypical ones, have numerous side effects. These undesirable

effects compromise the life quality of the patients and, consequently, their clinical use by causing the relapse of the treatment and the recurrence of the symptoms. Furthermore, about 30% of patients do not present remission under therapy with these drugs, which leads to the association of more than one class of antidepressants beyond other classes of drugs, as atypical antipsychotics. All of these pharmacological combinations predispose the patient to severe side effects [4].

Alternative to synthetic antidepressant drugs, the population uses some phytochemical preparations with relative success. Medicinal herbs have been marketed to treat depression [5], such as *Hypericum perforatum* commonly known as St. John's wort. *H. perforatum* has been used for treating mild to moderate forms of depression and its antidepressant effect is

attributed to inhibition either of monoamine oxidase (MAO) or serotonin reuptake [6, 7]. Therefore, the search for other natural compounds present in everyday life of the population could be interesting as auxiliary in the antidepressant treatment with fewer side effects than conventional therapy.

In this context, *Yerba mate* (*Ilex paraguariensis*) is a beverage commonly consumed in South America especially in Argentina, Brazil, Uruguay, and Paraguay. It is a stimulating beverage traditionally consumed as infusion locally known as “chimarrão” or “mate” [8]. Lately, the *I. paraguariensis* has gained rapid penetration into the worldwide markets, either as tea itself or as an ingredient in the industries of food and dietary supplement [9]. The *I. paraguariensis* has a range of biological activities which are attributed to its high polyphenol content. In addition to flavonoids as quercetin and rutin and phenolic compounds as chlorogenic and caffeic acids, *yerba mate* is also rich in caffeine and saponins [10]. The literature data have demonstrated that *I. paraguariensis* can improve the cognition of rats treated with acute administration of hydroalcoholic extract probably through its antagonist's action on adenosine receptors [11]. Another study showed that an infusion of *I. paraguariensis* can improve the memory of rats treated with haloperidol and this effect was related to an indirect modulation of oxidative stress [12]. Oxidative damage is implicated in the pathogenesis of various neuropsychiatric disorders including major depression [13–15]. However, besides innumerable studies about pharmacological properties of *I. paraguariensis*, any study was drawn to investigate if this plant has antidepressant-like effects.

In the present study, we evaluated the possible antidepressant-like effect of *I. paraguariensis* by using forced swimming test (FST) in rats. As a large quantity of antidepressant drugs act through monoamine oxidase inhibition, we investigated if the *I. paraguariensis* could modify the activity of this enzyme. Therefore, other behavioral and oxidative stress parameters were also evaluated considering the possible effects of *I. paraguariensis*.

2. Material and Methods

2.1. Chemical, Apparatus, and General Procedures. All chemical were of analytical grade. Acetonitrile, formic acid, gallic acid, chlorogenic acid, and caffeic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, theobromine, caffeine, rutin, catechin, and kaempferol were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Autosampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector, and LC solution 1.22 SP1 software.

2.2. Quantification of Phenolics and Flavonoids Compounds by HPLC-DAD. Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm) packed with 5 μ m diameter particles. The mobile phase was water containing 1% formic acid (A) and acetonitrile (B), and the composition gradient was

13% of B until 10 min and changed to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20%, and 10% B at 20, 30, 40, 50, 60, 70, and 80 min, respectively [16], with slight modifications. *I. paraguariensis* infusion was analyzed by dissolving in ethanol at a concentration of 20 mg/mL. The presence of nine antioxidants compounds was investigated, namely, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, catechin, quercetin, rutin, kaempferol, caffeine, and theobromine. Identification of these compounds was performed by comparing their retention time and UV absorption spectrum with those of the commercial standards. The flow rate was 0.7 mL/min, injection volume 50 μ L and the wavelengths were 254 nm for gallic acid, 270 nm for theobromine, 280 nm for catechin and caffeine, 327 nm for caffeic and chlorogenic acids, and 366 nm for quercetin, rutin, and kaempferol. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.045–0.300 mg/mL for kaempferol, quercetin, catechin, rutin, caffeine, and theobromine and 0.030–0.250 mg/mL for gallic, caffeic, and chlorogenic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing their retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 400 nm). Calibration curve for gallic acid was $Y = 12539x + 1305.3$ ($r = 0.9997$); catechin: $Y = 12851x + 1289.5$ ($r = 0.9998$); chlorogenic acid: $Y = 13079x + 1195.8$ ($r = 0.9992$); caffeic acid: $Y = 11978x + 1326.2$ ($r = 0.9994$); caffeine: $Y = 13276x + 1293.6$ ($r = 0.9995$); theobromine: $Y = 12473x + 1275.8$ ($r = 0.9996$); rutin: $Y = 12763 + 1265.7$ ($r = 0.9999$); quercetin: $Y = 11780x + 1362.6$ ($r = 0.9995$); and kaempferol: $Y = 12583x + 1238.9$ ($r = 0.9997$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve [17].

2.3. Animals. Male Wistar rats (with 2 months of age) weighing 200 to 250 g from our breeding colony were kept in cages with five animals each with continuous access to food and water or infusion of *I. paraguariensis*. The room housing the cages was temperature-controlled ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and on a 12 h light/dark cycle with the lights going on at 7:00 a.m. Animals were maintained and used in accordance to the guidelines of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (Ethics Committee Approval number A011-09).

2.4. Experimental Design. *I. paraguariensis* was obtained from local supermarkets in a form of herb consumed by population. The extract was prepared as infusion like “chimarrão” or “mate.” Herbal commercial samples (25 g) were weighed and put into 500 mL of hot water (70°C) [12]. The infusion was filtered using filter paper and then cooled to room temperature. The yield of mate infusion was 30.45%. An aliquot of the infusion was subjected to qualitative analyses by HPLC. The extracts of mate were daily prepared and

offered to the animals in place of drinking water during four weeks [12] ad libitum. Any difference of liquid ingestion was observed between the groups (data not shown). The dose of dry extract per rat was calculated with the values obtained in gravimetric assay and estimated at 2.31 g/kg/day. After four weeks, behavioral analysis of locomotor activity and anxiety was evaluated in animals receiving water ($n = 11$) or *I. paraguariensis* ($n = 9$). Our intent with elevated plus-maze and open field tests was to avoid any possible false positive result in the FST, since the alterations in locomotion or anxiety could modify the response of the animals in FST. After this evaluation, the group that received water was subdivided into two groups. One group of animals received two administrations of selegiline (10 mg/kg, i.p., dissolved in 0.9% NaCl), 24 hours and 30 minutes, before FST [18]. This group was the positive control to antidepressant activity and MAO inhibition. Thus, the experimental groups were named as: control ($n = 6$), *I. paraguariensis* ($n = 9$), and selegiline ($n = 5$). After the behavioral analysis, the animals were killed by decapitation and the brains were immediately excised and used in biochemical assays.

2.5. Behavioral Analysis

2.5.1. Elevated Plus-Maze. To evaluate possible alterations in anxiety-like state caused by treatment with *I. paraguariensis*, animals were exposed to an elevated plus-maze apparatus [19, 20]. The percentage of time spent on open arm and the percentage of the entries into the open arms were calculated as follows: time spent or number of entries into the open arm/total time or total number of the entries into closed and open arms $\times 100$, respectively.

2.5.2. Open Field Test. To analyze possible changes in spontaneous locomotor and exploratory activity caused by treatment with *I. paraguariensis*, the animals were placed individually in the center of a circular open field arena divided into nine parts [21]. The effect of drugs on behavior was examined after *I. paraguariensis* treatment (on day 30). The number of rearing and the number of line crossings were measured over 5 min. Sections of open field test were evaluated 1 hour after elevated plus maze test.

2.5.3. Forced Swimming Test. This experiment was performed using the FST according to the method previously published by Porsolt et al. [22, 23]. The effects of *I. paraguariensis* on FST were investigated after 24 hours and 4 weeks of treatment. Male rats were placed into a cylinder with a diameter of 40 cm containing a column of 17 cm of water at 27°C. The animals were trained 24 hours before the test for 5 min. Twenty-four hours later, the animals were exposed to the same experimental conditions for 5 min. A rat was judged to be immobile whenever it remained floating in the water, in an upright position, making only small movements to keep its head above the water. The immobility time was taken.

2.6. Tissue Preparations. Rats were killed about 1 hour after the last session of behavioral. The brains were immediately

excised and put on ice. Then, they were homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 4000 $\times g$ for 10 min to yield a low-speed supernatant fraction (S1) that was used for the biochemical assays.

2.7. Biochemical Assays

2.7.1. Lipid Peroxidation Assay. To evaluate the participation of lipid peroxidation in the action of *I. paraguariensis* or selegiline, thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were determined as described by [24]. In brief, samples were incubated at 100°C for 1 hour in a medium containing 8.1% sodium dodecyl sulfate, 1.4 M acetic acid, pH 3.4, and 0.6% thiobarbituric acid. The pink chromogen produced in the reaction was measured spectrophotometrically at 532 nm. Results were expressed as nmol of TBARS/g of tissue.

2.7.2. SH Levels. The total SH (TSH) and non-protein-SH (NPSH) content from samples were determined as described by [25]. For the nonprotein thiol groups (NP) determination, the samples of S1 were precipitated with 200 μL of 10% trichloroacetic acid followed by centrifugation. The colorimetric assay was carried out in phosphate buffer 1M, pH 7.4. The reaction was measured spectrophotometrically at 412 nm. Results were expressed as $\mu g/g$ of tissue.

2.7.3. Vitamin C Levels. Cerebral vitamin C (ascorbic acid (AA)) levels were determined as described by Jacques-Silva et al. [26]. Brain homogenates were precipitated with 1 volume of 10% trichloroacetic acid followed by centrifugation. An aliquot of 300 μL of the supernatants was mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (4.5 mg/mL), $CuSO_4$ (0.075 mg/mL), and trichloroacetic acid 13.3% (final volume 1 mL) and incubated for 3 h at 37°C. Then 1 mL of H_2SO_4 65% (v/v) was added to the medium. The ascorbic acid levels were measured spectrophotometrically at 520 nm and calculated using a standard curve (1.5–4.5 μM ascorbic acid freshly prepared in sulfuric acid).

2.7.4. MAO Activity Assay. MAO activity was determined by measuring the kynuramine oxidation to 4-hydroxyquinoline [27–29]. The samples were preincubated at 37°C for 10 min with the irreversible and selective inhibitor clorgyline (250 nM) or pargyline (250 nM) to assay MAO-A or MAO-B activity, respectively. After 10 min, kynuramine was added as a nonselective substrate at concentrations equal to the corresponding K_m value (45 μM for MAO-A and 30 μM for MAO-B). The reaction was incubated during 30 min at 37°C. After this time, the reaction was stopped with trichloroacetic acid (TCA) 10%. The samples were centrifuged at 5,000 $\times g$ for 5 min. It was added to supernatant 1M NaOH. The reaction was measured by fluorimetric method, using 315 nm (excitation) and 380 nm (emission). The results are represented as fluorescence intensity/mg protein.

2.7.5. Protein Quantification. The total protein content in homogenates (S1) was determined by the method of Lowry

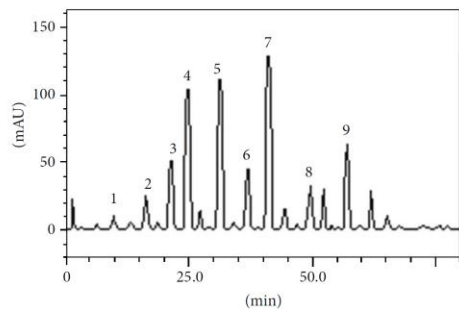


FIGURE 1: Representative high performance liquid chromatography profile of *Ilex paraguariensis* infusion, detection of UV was at 327 nm. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), caffeine (peak 5), theobromine (peak 6), rutin (peak 7), quercetin (peak 8), and kaempferol (peak 9).

and Rosebrough [30], using bovine serum albumin as standard.

2.8. *Statistical Analysis.* Data were analyzed by unpaired *t*-test or one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test when appropriate. Significance was considered when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. *HPLC Analysis.* HPLC fingerprinting of *Ilex paraguariensis* infusion revealed the presence of the gallic acid ($t_R = 10.17$ min; peak 1), catechin ($t_R = 16.23$ min; peak 2), chlorogenic acid ($t_R = 22.56$ min; peak 3), caffeic acid ($t_R = 24.97$ min; peak 4), caffeine ($t_R = 31.48$ min; peak 5), theobromine ($t_R = 37.12$ min; peak 6), rutin ($t_R = 41.73$ min; peak 7), quercetin ($t_R = 50.14$ min; peak 8), and kaempferol ($t_R = 57.39$ min; peak 9) (Figure 1 and Table 1).

3.2. *Effects of Treatment with I. paraguariensis on Elevated Plus-Maze Test in Rats.* *I. paraguariensis* did not cause any significant effect on the number of head dipping, percentage of the time spent, and number of entries on the open arms of elevated plus-maze apparatus (Table 2).

3.3. *Effects of Treatment with I. paraguariensis on Locomotor and Exploratory Activity in Rats.* *I. paraguariensis* treatment did not cause any effect on locomotor activity represented by number of crossings (Figure 2(a)). However, the number of rearing on the open field test was observed, *I. paraguariensis* caused a decrease in the number of rearing ($P < 0.05$; Figure 2(b)) in the open field test after 4 weeks of treatment.

3.4. *Effects of Treatment with I. paraguariensis on Forced Swimming Test in Rats.* To verify the possible antidepressant-like effects of *I. paraguariensis*, the FST was used. Statistical analyses revealed that aqueous extract of *I. paraguariensis*

TABLE 1: Composition of *Ilex paraguariensis* infusion.

Compounds	<i>Ilex paraguariensis</i> mg/g	%	LOD $\mu\text{g/mL}$	LOQ $\mu\text{g/mL}$
Gallic acid	0.65 ± 0.01^a	0.06	0.016	0.052
Catechin	1.74 ± 0.03^b	0.17	0.029	0.095
Chlorogenic acid	5.31 ± 0.01^c	0.53	0.008	0.027
Caffeic acid	12.26 ± 0.03^d	1.22	0.035	0.115
Caffeine	13.47 ± 0.01^d	1.34	0.015	0.049
Theobromine	5.03 ± 0.01^c	0.50	0.007	0.023
Rutin	17.82 ± 0.03^e	1.78	0.026	0.086
Quercetin	3.16 ± 0.01^b	0.31	0.032	0.104
Kaempferol	7.58 ± 0.02^f	0.75	0.019	0.063

Results are expressed as mean \pm standard deviations (SD) of three determinations.

Averages followed by different letters differ by Tukey's test at $P < 0.05$.

TABLE 2: Effects of *I. paraguariensis* on elevated plus-maze test in rats during 5 minutes.

	Head dipping (5 min)	Entry into open arms (%)	Time spent into open arms (%)
Control	6.07 ± 1.60	17.93 ± 4.32	9.67 ± 3.40
<i>I. paraguariensis</i>	6.13 ± 0.96	18.10 ± 3.19	14.91 ± 5.31

Values are represented as means \pm SEM (control, $n = 11$; *I. paraguariensis*, $n = 9$).

caused a significant reduction of immobility time in FST in relation to control group either when administered during 24 hours ($F(2, 11) = 18.73$, $P < 0.05$; Figure 3(a)) or 4 weeks ($F(2, 19) = 25.45$, $P < 0.05$; Figure 3(b)). Furthermore, selegiline, a MAO inhibitor, caused a significant reduction in immobility time in relation to control and *I. paraguariensis* group in this test ($P < 0.05$; Figure 3).

3.5. *Effects of I. paraguariensis on MAO-A and MAO-B Activity.* Since we detected a reduction in immobility in forced swimming test in rats treated with *I. paraguariensis*, we verified if this effect was caused by a possible inhibitory effect of *I. paraguariensis* on MAO-A or MAO-B activity (Figure 4). Selegiline administration was a positive control and caused a significant reduction in MAO-B activity ($F(2, 11) = 78.80$, $P < 0.05$; Figure 4(c)). However, the activities of either MAO-A or MAO-B were not modified after treatment with *I. paraguariensis* (Figure 4).

3.6. *Effects of I. paraguariensis on Oxidative Stress Parameters.* As *I. paraguariensis* and selegiline are known by their antioxidant activity, we carried out assays for lipid peroxidation, levels of nonprotein SH, and ascorbic acid to verify possible changes in oxidative stress parameters that could modulate the MAO activity or could be a signal of protection/toxicity of both tested drugs. However, there was no significant difference among the groups in TBARS, nonprotein SH,

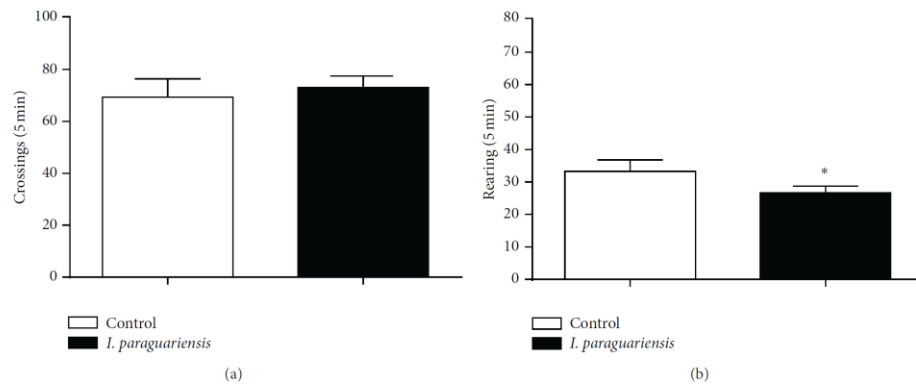


FIGURE 2: Effects of *I. paraguariensis* in the open field test in rats after 4 weeks of treatment. (a) Number of crossings and (b) rearing in 5 min. Values of number of crossings and rearing are represented by means \pm SEM; control, $n = 11$; *I. paraguariensis*, $n = 9$. *Significant differences from control group.

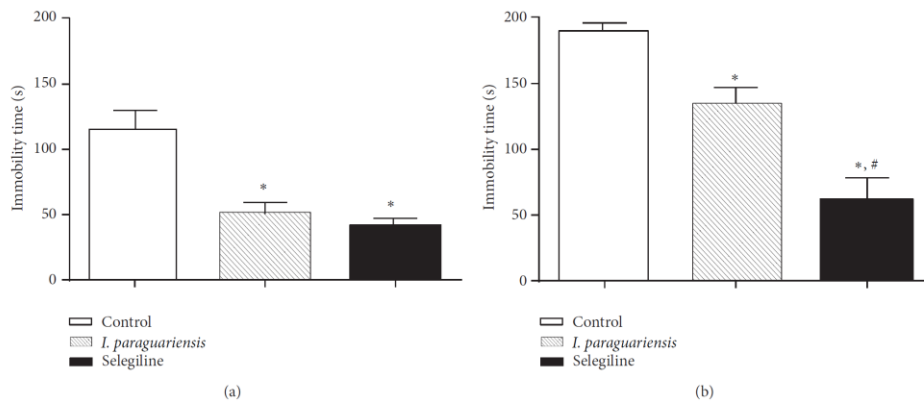


FIGURE 3: Effects of *I. paraguariensis* and selegiline on forced swimming test after (a) 24 hours and (b) 4 weeks of treatment with *I. paraguariensis* or two administrations (24 hours and 30 min before the test) of selegiline (10 mg/kg; i.p.). Values of immobility time are represented by means \pm SEM (a); control, $n = 4$; *I. paraguariensis*, $n = 5$; and selegiline, $n = 5$; (b) control, $n = 6$; *I. paraguariensis*, $n = 9$; and selegiline, $n = 5$ (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). * represents significant differences from control group and # represents significant differences from *I. paraguariensis* group.

and ascorbic acid levels in rats under treatment with *I. paraguariensis* (Table 3).

4. Discussion

The present study aimed to evaluate the possible antidepressant-like effect of *I. paraguariensis* in rats. We demonstrated that the treatment with *I. paraguariensis* decreased the immobility time on FST at 24 hours and this effect was the same after four weeks; a behavioral parameter was used to investigate the antidepressant potential of the drugs. Furthermore, the reduction in time of immobility by *I. paraguariensis* on

FST was not associated with effects neither on locomotor nor on anxiolytic/anxiogenic activity. The antidepressant-like effect of *I. paraguariensis* was not associated with inhibitory effects on monoamine oxidase activity.

The Literature showed that *I. paraguariensis* has stimulant effects on central nervous system. Thus, the purpose of this study was to evaluate the antidepressant-like effect of *I. paraguariensis*. Despite previous some studies show the antidepressant-like activity of flavonoids [31, 32] which are present in the extract of *I. paraguariensis*, any study has evaluated the possible antidepressant-like activity of it. The present study showed that *I. paraguariensis* significantly reduced the

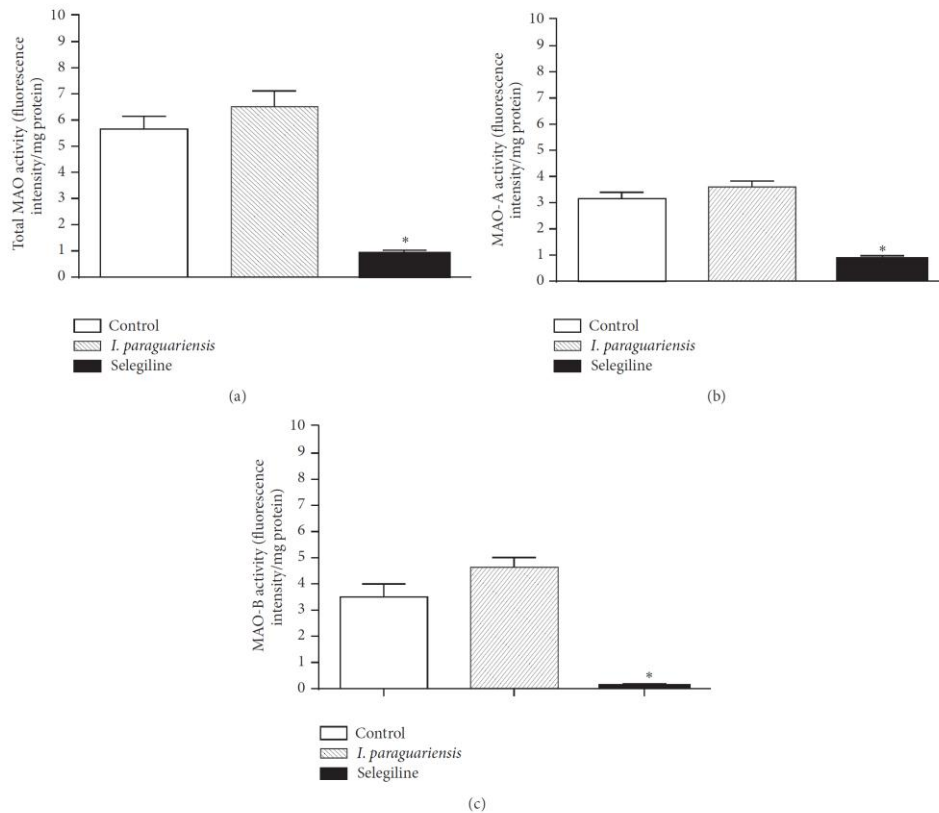


FIGURE 4: Effects of *I. paraguariensis* or selegiline on monoamine oxidase activity after 4 weeks of treatment with *I. paraguariensis* or two administrations (24 hours and 30 min before the test) of selegiline (10 mg/kg; i.p.). Values represent means \pm SEM; control, $n = 6$; *I. paraguariensis*, $n = 9$; and selegiline, $n = 5$. * represents significant differences from control group and *I. paraguariensis* group.

TABLE 3: Effects of *I. paraguariensis* or selegiline treatments on oxidative stress parameters.

	TBARS (nmol of MDA/g tissue)	Nonprotein— SH (μ mol/g tissue)	Vitamin C (μ g of ascorbic acid/g tissue)
Control	148.30 \pm 26.78	6.33 \pm 1.22	608.70 \pm 73.30
<i>I. paraguariensis</i>	157.60 \pm 14.83	5.99 \pm 0.61	643.10 \pm 27.09
Selegiline	210.20 \pm 44.01	3.69 \pm 0.23	739.20 \pm 47.80

Mean \pm SEM; with control, $n = 6$; *I. paraguariensis*, $n = 9$; selegiline, $n = 5$.

immobility time on FST either after 24 hours or four weeks of treatment. HPLC analysis revealed the presence of caffeine in our extract. The percentage of caffeine was a little lesser than other ones [33, 34]. These differences can be attributed to the method of extraction and the different trademarks used

in these studies. Previous studies demonstrated that caffeine exerts stimulant effects on motor activity of mice and rats [35]. Thus, in order to exclude a false positive, we use the open field test to verify possible alterations in locomotor activity in rats caused by *I. paraguariensis*. The treatment did not cause any effect on locomotor activity represented by the number of crossings, but when the number of rearing on the open field test was observed, *Ilex paraguariensis* caused a decrease in this number. These data can suggest that other compounds present in extract are able to decrease the number of rearing since caffeine has no effect on the central control of vertical activity [36]. In the same way, we evaluated if the presence of stimulants compounds like caffeine and theobromine in the extract of *I. paraguariensis* could cause anxiety. Furthermore, some studies have demonstrated that antidepressant agents can also possess anxiolytic properties in different anxiety animal models [36–38]. Thus, we investigated if *I. paraguariensis* treatment exerts anxiety or anxiolytic activity by using the

plus-maze test. However, any significant effect was observed on elevated plus-maze test.

Monoamine oxidase is an enzyme responsible for degradation of monoamines, such as serotonin, dopamine, and norepinephrine. Moreover, the abnormal activity of the enzyme has been implicated in pathophysiology of depression [39–41]. The inhibition of MAO activity promotes an increase in monoamines and is one important target for the treatment of depression. Monoamine oxidase inhibitors have been used for decades in the treatment of depression and their antidepressant properties result from selective MAO-A inhibition in the central nervous system, which could lead to increased brain levels of 5-HT, NE, and DA [42, 43]. Recently, selegiline, an MAO-B inhibitor, has been used with success in the treatment of patients that are refractory to other antidepressant in a pharmaceutical transdermal preparation to avoid food interactions [44, 45]. We also investigated the involvement of the MAO in the possible antidepressant-like effect of *I. paraguariensis*. In the present study, MAO activity was not modified after treatment with *I. paraguariensis*. Thus, the antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* represented by decrease in immobility time on FST seems not to be associated with MAO inhibition. Natural products have demonstrated numerous benefits in several animal models suggesting that antioxidant compound could exert protective effects [46–50]. However, there are studies showing that depending on the dose of the antioxidant compounds used, they could be prooxidants, causing toxicity and modulation in MAO activity by redox alteration [51, 52]. Selegiline was used as a positive control in our study because it possesses both MAO inhibitory activity and antioxidant properties [53]. We did not observe significant difference in oxidative stress parameters in this model. However, as we used a total brain homogenate in our study, some effects could better appear if they were analyzed in brain specific region.

5. Conclusion

In conclusion, the present study showed that *Ilex paraguariensis* presents an important effect on reducing immobility time on forced swimming test which could suggest an antidepressant-like effect of this extract. This effect is not associated with MAO inhibition or alterations in the parameters of oxidative stress. Furthermore, the extract did not show anxiolytic or anxiogenic activity. However, additional studies are needed to better understand the action mechanism of *I. paraguariensis*.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

The financial support by PRONEM no. 11/2029-1, CNPq (473365/2009-0), and FINEP Research Grant from “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” (01.06.0842-00) are gratefully acknowledged. Alcindo Busanello and Luis

Ricardo Peroza are recipients of CAPES-DS fellowship. Caroline Queiroz Leal received a fellowship from CNPq/PIBIC.

References

- [1] L. E. Schechter, R. H. Ring, C. E. Beyer et al., “Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies,” *The Journal of American Society for Experimental Neuro Therapeutics*, vol. 2, no. 4, pp. 590–611, 2005.
- [2] C. B. Nemeroff and M. J. Owens, “Treatment of mood disorders,” *Nature Neuroscience*, vol. 5, pp. 1068–1070, 2002.
- [3] R. H. Belmaker and G. Agam, “Major depressive disorder,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 1, pp. 55–68, 2008.
- [4] M. J. Millan, “Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 110, no. 2, pp. 135–370, 2006.
- [5] C. D. Chambers, S. Hernandez-Diaz, L. J. Van Marter et al., “Selective serotonin-reuptake inhibitors and risk of persistent pulmonary hypertension of the newborn,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 354, no. 6, pp. 579–587, 2006.
- [6] C. L. Istikoglou, V. Mavreas, and G. Geroulanos, “History and therapeutic properties of Hypericum Perforatum from antiquity until today,” *Psychiatrike*, vol. 21, no. 4, pp. 332–338, 2010.
- [7] V. Butterweck, “Mechanism of action of St John’s wort in depression: what is known?” *CNS Drugs*, vol. 17, no. 8, pp. 539–562, 2003.
- [8] P. Mazzafera, “Mate drinking: caffeine and phenolic acid intake,” *Food Chemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 67–71, 1997.
- [9] C. I. Heck and E. G. De Mejia, “Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations,” *Journal of Food Science*, vol. 72, no. 9, pp. R138–R151, 2007.
- [10] D. H. M. Bastos, D. M. De Oliveira, R. L. T. Matsumoto, P. O. Carvalho, and M. L. Ribeiro, “Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology,” *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, vol. 1, no. 1, pp. 37–46, 2007.
- [11] R. D. S. Prediger, M. S. Fernandes, D. Rial et al., “Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 120, no. 3, pp. 465–473, 2008.
- [12] G. Colpo, F. Trevisol, A. M. Teixeira et al., “*Ilex paraguariensis* has antioxidant potential and attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and memory dysfunction in rats,” *Neurotoxicity Research*, vol. 12, no. 3, pp. 171–180, 2007.
- [13] M. Bilici, H. Efe, M. A. Köroğlu, H. A. Uydu, M. Bekaroğlu, and O. Değer, “Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments,” *Journal of Affective Disorders*, vol. 64, no. 1, pp. 43–51, 2001.
- [14] S. D. Khanzode, G. N. Dakhale, S. S. Khanzode, A. Saoji, and R. Palasodkar, “Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin-reuptake inhibitors,” *Redox Report*, vol. 8, no. 6, pp. 365–370, 2003.
- [15] E. M. Reis, J. Röpke, A. Busanello et al., “Effect of Hypericum perforatum on different models of movement disorders in rats,” *Behavioural Pharmacology*, vol. 24, pp. 623–627, 2013.
- [16] J. P. Kamdem, E. O. Olalekana, W. Hassan et al., “*Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against

- oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices," *Industrial Crops and Products*, vol. 50, pp. 625–632, 2013.
- [17] A. A. Boligon, T. F. Kubiça, D. N. Mario et al., "Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts," *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 35, no. 7, pp. 2229–2239, 2013.
- [18] Y. Kitamura, K. Kitagawa, S. Kimoto et al., "Selegilin exerts antidepressant-like effects during the forced swim test in adrenocorticotrophic hormone-treated rats," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 106, no. 4, pp. 639–644, 2008.
- [19] P. Chopin, A. Stenger, J. P. Couzinier, and M. Briley, "Indirect dopaminergic effects of tofisopam, a 2,3-benzodiazepine, and their inhibition by lithium," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 37, no. 12, pp. 917–919, 1985.
- [20] S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, and M. Briley, "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 14, no. 3, pp. 149–167, 1985.
- [21] P. L. Broadhurst, "The place of animal psychology in the development of psychosomatic research," *Fortschritte der Psychosomatischen Medizin*, vol. 1, pp. 63–69, 1960.
- [22] R. D. Porsolt, M. Le Pichon, and M. Jalfre, "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments," *Nature*, vol. 266, no. 5604, pp. 730–732, 1977.
- [23] R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, and M. Jalfre, "Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments," *European Journal of Pharmacology*, vol. 47, no. 4, pp. 379–391, 1978.
- [24] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 351–358, 1979.
- [25] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, 1959.
- [26] M. C. Jacques-Silva, C. W. Nogueira, L. C. Broch, E. M. Flores, and J. B. Rocha, "Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice," *Pharmacology and Toxicology*, vol. 88, no. 3, pp. 119–125, 2001.
- [27] R. Soto-Otero, E. Méndez-Álvarez, Á. Hermida-Ameijeiras, I. Sánchez-Sellero, A. Cruz-Landeira, and M. L.-R. Lamas, "Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals potential implications in relation to oxidative stress," *Life Sciences*, vol. 69, no. 8, pp. 879–889, 2001.
- [28] G. D. S. Sant' Anna, P. Machado, P. D. Sauzem et al., "Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 19, no. 2, pp. 546–549, 2009.
- [29] J. G. Villarinho, R. Fachinnetto, F. Pinheiro et al., "Antidepressant-like effect of the novel MAO inhibitor 2-(3, 4-dimethoxy-phenyl)-4, 5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI) in mice," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 39, no. 1, pp. 31–39, 2012.
- [30] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [31] V. Butterweck, G. Jürgenliemk, A. Nahrstedt, and H. Winterhoff, "Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test," *Planta Medica*, vol. 66, no. 1, pp. 3–6, 2000.
- [32] M. Nöldner and K. Schötz, "Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test," *Planta Medica*, vol. 68, no. 7, pp. 577–580, 2002.
- [33] R. Filip, T. Sebastian, G. Ferraro, and C. Anesini, "Effect of Ilex extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, no. 4, pp. 649–655, 2007.
- [34] A. D. Meinhart, C. S. Bizzotto, C. A. Ballus et al., "Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 4, pp. 2188–2193, 2010.
- [35] A. Nehlig, J.-L. Daval, and G. Debry, "Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects," *Brain Research Reviews*, vol. 17, no. 2, pp. 139–169, 1992.
- [36] R. N. Hughes and A. M. Greig, "Effects of caffeine, methamphetamine and methylphenidate on reactions to novelty and activity in rats," *Neuropharmacology*, vol. 15, no. 11, pp. 673–676, 1976.
- [37] L. De Angelis, "Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 354, no. 3, pp. 379–383, 1996.
- [38] L. Eroğlu and Ö. Güven, "The effects of moclobemide on the yohimbine-induced anxiogenic action in the elevated plus-maze," *Pharmacological Research*, vol. 37, no. 2, pp. 137–143, 1998.
- [39] C. Lanni, S. Govoni, A. Lucchelli, and C. Boselli, "Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 18, pp. 2985–3008, 2009.
- [40] H. K. Manji, J. A. Quiroz, J. Sporn et al., "Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression," *Biological Psychiatry*, vol. 53, no. 8, pp. 707–742, 2003.
- [41] M. J. Millan, "The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review," *European Journal of Pharmacology*, vol. 500, no. 1–3, pp. 371–384, 2004.
- [42] F. López-Muñoz, C. Álamo, G. Juckel, and H.-J. Assion, "Half a century of antidepressant drugs—on the clinical introduction of monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, and tetracyclics—part I: monoamine oxidase inhibitors," *Journal of Clinical Psychopharmacology*, vol. 27, no. 6, pp. 555–559, 2007.
- [43] D. S. Robinson, "Monoamine oxidase inhibitors: a new generation," *Psychopharmacology Bulletin*, vol. 36, no. 3, pp. 124–138, 2002.
- [44] C. U. Pae, J. A. Bodkin, K. B. Portland, M. E. Thase, and A. A. Patkar, "Safety of selegiline transdermal system in clinical practice: analysis of adverse events from postmarketing exposures," *Journal of Clinical Psychopharmacology*, vol. 73, no. 5, pp. 661–668, 2012.
- [45] M. E. Thase, "The role of monoamine oxidase inhibitors in depression treatment guidelines," *Journal of Clinical Psychiatry*, vol. 73, no. 1, pp. 1–10, 2012.
- [46] A. Busanello, N. B. V. Barbosa, L. R. Peroza et al., "Resveratrol protects against a model of vacuuous chewing movements induced by reserpine in mice," *Behavioural Pharmacology*, vol. 22, no. 1, pp. 71–75, 2011.
- [47] R. P. Pereira, R. Fachinnetto, A. De Souza Prestes et al., "Valeriana officinalis ameliorates vacuuous chewing movements induced by

- reserpine in rats," *Journal of Neural Transmission*, vol. 118, no. 11, pp. 1547–1557, 2011.
- [48] A. Busanello, L. R. Peroza, C. Wagner et al., "Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 101, no. 2, pp. 307–310, 2012.
- [49] L. R. Peroza A Busanello, C. Q. Leal, J. Röpke et al., "Bauhinia forficata prevents vacuous chewing movements induced by haloperidol in rats and has antioxidant potential in vitro," *Neurochemical Research*, vol. 38, no. 4, pp. 789–796, 2013.
- [50] L. F. Schaffer, L. R. Peroza, A. A. Boligon et al., "Harpagophytum procumbens prevents oxidative stress and loss of cell viability in vitro," *Neurochemical Research*, vol. 38, no. 11, pp. 2256–2267, 2013.
- [51] G. Galati, T. Chan, B. Wu, and P. J. O'Brien, "Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 12, no. 6, pp. 521–525, 1999.
- [52] E. J. Choi, K.-M. Chee, and B. H. Lee, "Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 482, no. 1–3, pp. 281–285, 2003.
- [53] P. Sachdev, T. Saharov, and S. Cathcart, "The preventative role of antioxidants (selegiline and vitamin E) in a rat model of tardive dyskinesia," *Biological Psychiatry*, vol. 46, no. 12, pp. 1672–1681, 1999.

4.2 MANUSCRITO

4.2.1 Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems

Periódico: Submetido à revista Behavioral Pharmacology

Autores: Elizete De Moraes Reis; Alcindo Busanello; Catiúscia Molz de Fretas; Larissa Finger Schaffer; Ana Paula Chiapinotto Ceretta; Patrícia Reckziegel; Caroline Queiroz Leal; Romaiana Picada Pereira, Roselei Fachinetto.

ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT OF *ILEX PARAGUARIENSIS* IN MICE: EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF MONOAMINERGIC SYSTEM

^AElizete De Moraes Reis; ^BCatiuscia Molz de Fretas; ^AAlcindo Busanello;
;^ALarissa Finger Schaffer; ^AAna Paula Chiapinotto Ceretta; ^A Patrícia
Reckziegel; ^CCaroline Queiroz Leal; ^CRomaiana Picada Pereira,^{A,B,*}Roselei
Fachinetto.

^A*Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^B*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^C*Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brazil*

Corresponding author:

Dr^a. Roselei Fachinetto

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel: x21-55-3220 8096

Fax: x21-55-3220 8241

e-mail: roseleirf@gmail.com

4.2.1.1 Abstract

Ilex paraguariensis is a stimulating beverage largely consumed in South America as an infusion locally known as “chimarrão” or “mate”. The current was demonstrated antidepressant-like effect of *I. paraguariensis* in rats. This study investigated if the antidepressant-like effect of *I. paraguariensis* infusion involves monoaminergic mechanisms in mice. They received three different concentrations (0.05, 0.1 or 0.2 g/mL) of *I. paraguariensis* infusion in place of drinking water during 24 hours or 7 days. The animals were submitted to forced swimming test (FST), tail suspension test (TST) and open field after 24 hours of treatment and 24 hours after the last day of treatment. *I. paraguariensis* reduced the immobility time in the FST after 24 hours and 7 days of treatment and in TST only after 24 hours of treatment with 0.05 and 0.1 g/mL, without alterations on locomotor activity. It was evaluated the monoamine oxidase (MAO) activity *in vitro* and *ex vivo*. The highest concentrations of *I. paraguariensis* (100 and 300 µg/mL) reduced the activity of both MAO isoforms *in vitro*. However, any alteration in the MAO activity was observed in cortex and hippocampus of mice *ex vivo*. Also, it was investigated the involvement of the monoaminergic system. The animals were pretreated with p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA) (100 mg/kg, i.p., an inhibitor of tryptophan hydroxylase) or 3-iodo-L-tyrosine (100 mg, i.p., an inhibitor of the enzyme tyrosine hydroxylase) or vehicle, once a day, for 4 consecutive days. Then, in the third day of the treatment with 3-iodo-L-tyrosine/PCPA or vehicle injection, the animals were concomitantly treated with the infusion of *I. paraguariensis* (0.05 g/mL, in place of drinking water) or water and were tested in TST or FST 24 hours later. The effects of *I. paraguariensis* were avoided by 3-iodo-tyrosine in TST and PCPA in FST. Taken together, the present results show that *I. paraguariensis* presents antidepressant-like activity suggesting the involvement of monoaminergic system.

key-words: Yerba Mate, forced swimming test, tail suspension test, depression, monoaminoxidase.

4.2.1.2 Introduction

Ilex paraguariensis (Aquifoliaceae), known commonly as yerba mate, is a plant native from South America including Brazil, Paraguay and Argentina (Bradesco et al., 2011). The aqueous extract of this plant is mainly consumed as beverages known as “chimarrão” or “mate” and it is a stimulating beverage prepared with dried leaves of *I. paraguariensis* and hot water (Bastos, 2007). The *I. paraguariensis* is rich in polyphenols, flavonoids as quercetin and rutin, phenolic compounds as chlorogenic and caffeic acids and high amount of caffeine and saponins (Heck and Meijia, 2007).

Recent studies have demonstrated that *I. paraguariensis* can act in central nervous system (CNS). *I. paraguariensis* was able to improve the cognition of rats treated with acute administration of hydroalcoholic extract (Prediger et al., 2008) and improving the memory performance of rats treated with haloperidol (Colpo et al., 2007). Reis et al., (2014) and Ludka et al., (2016) demonstrated the antidepressant-like effect of the different extracts of the *I. paraguariensis* in rats and mice.

Depression has become a common neuropsychiatric disorder and one the most causes of disability in the world (Kessler, 2012; Cramer et al., 2017). However, the results of the antidepressant therapies require some weeks of the treatment for improving of symptoms with a rate success of about 60% (Wong and Licinio, 2001; Di Giovanni et al., 2016). There are several classes of the antidepressant used to treat patients with depression as tricyclic, monoamine oxidase inhibitors, selective serotonin reuptake inhibitors, atypical antidepressant and others (Belmarker and Agam, 2008). Mostly antidepressant act modulating serotonergic, noradrenergic and/or dopaminergic systems (Elhwuegi, 2004). Antidepressant drugs have reasonable efficacy, but are often associated with significant side effects (Tchachel et al., 2007). Thus, the search for natural compounds used by the population could be interesting as auxiliary in the antidepressant treatment with fewer adverse effects than conventional therapy.

Therefore, the present study aimed to evaluate the activity of different concentrations of *I. paraguariensis* infusion as well as if the antidepressant-like effect involves the monoaminergic system.

4.2.1.3 Materials and Methods

Animals

Male Swiss mice (25–35 g) were maintained in a room with controlled temperature (22–27 °C) with free access to water and food, under a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 07:00). Mice were allowed to acclimatize to the holding room for 1 h before the behavioral procedure. All experiments were performed in accordance to the guidelines of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA). This protocol was approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria under process number 073/2014.

Drugs

The following drugs were used: p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA), 3-iodo-L-tyrosine (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA).

In vitro experiment

Determination of I. paraguariensis effects on MAO activity

I. paraguariensis was tested for its *in vitro* inhibitory potential on mice MAO-A and MAO-B activities in brain preparations by a fluorometric method using kynuramine as a substrate, as previously described (Matsumoto et al., 1985; De Oliveira et al., 2016). Briefly, assays were performed in duplicate in a final volume of 500 μ L containing 0.25 mg of protein and incubated at 37°C for 30 min. Activities of the A and B isoforms were isolated pharmacologically by incorporating 250 nM pargyline (selective MAO-B inhibitor) or 250 nM clorgyline (selective MAO-A inhibitor) into the reaction mix. The reaction mixture (containing mitochondrial fractions, *I. paraguariensis* and inhibitors) was pre-incubated at 37°C for 10 min, and the reaction was started by the addition of 50 μ L of kynuramine (90 μ M for MAO-A and 60 μ M for MAO-B). Also, *I. paraguariensis* was tested at a concentration range of 1 to 300 μ g/mL, and the IC₅₀ for both MAO isoforms were determined.

Experimental design 1

To mimic the form of consumption used by population it was used the infusion. The characterization of the extract was previously published (Reis et al., 2014). The infusion was tested in three different concentrations of *I. paraguariensis* (0.05; 0.1 and 0.2 g/mL). Herbal commercial samples were weighted and put into hot water (70°C). The infusion was filtered using filter paper and then cooled to room temperature. The infusion of *I. paraguariensis* was prepared daily and offered to the animals in place of drinking water during 7 days, *ad libitum*. The animals were divided into four groups receiving water (n=5-8) or *I. paraguariensis* in different concentrations (n=5-8). Liquid consumption was measured daily which was similar among the groups receiving water (8.61±0.83 mL/day/animal), *I. paraguariensis* 0.05 g/mL (9.08±1.25 mL/day/animal) and *I. paraguariensis* 0.1 g/mL (8.9±0.75 mL/day/animal). Only the group receiving *I. paraguariensis* 0.2 g/mL presented a significant increase in the liquid consumption (15±1.66 mL/day/animal) compared to the other groups. Behavioral analysis of locomotor activity and antidepressant-like effect were evaluated 24 hours after initiation of the treatment and 24 hours after the last day of treatment.

Tail suspension test (TST)

The total duration of immobility induced by tail suspension test was measured according to the method described by Steru et al., (1985). Briefly, mice were suspended 50 cm above the floor by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Immobility time was recorded manually during a 6 minutes period (Rodrigues et al., 2002; Machado et al., 2007).

Forced swimming test (FST)

Mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 10 cm, height 25 cm), containing 19 cm of water (depth) at 25±1 °C; the total duration of immobility was recorded during 4 minutes after 2 minutes of adaptation. Each mouse was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water. A decrease in the duration of immobility is indicative of an antidepressant-like effect (Porsolt et al., 1977).

Open field test

To quantify locomotor activity, the animals were placed individually in an open field arena divided into nine parts (Broadhurst, 1960). The number of rearing and lines crossed were measured over 5 min.

Determination of MAO activity ex vivo

After the behavioral analyses, the mice were anesthetized with ketamine:xilazine (100mg/Kg:10mg/kg, i.p.) and submitted to cervical dislocation and then to decapitated, the brain of each animal was removed. The cortex and hippocampus were quickly dissected placed in dry ice and immediately stored at -80°C until the use. MAO activity was determined by a fluorometric method using kynuramine as a substrate, as previously described by De Freitas et al., (2016).

Experimental Design 2

In order to investigate the involvement of the serotonergic or noradrenergic system in the antidepressant-like effect of the *I. paraguariensis* infusion, the animals were pretreated with PCPA (100 mg/kg, i.p., an inhibitor of tryptophan hydroxylase) or 3-iodo-L-tyrosine (100 mg, i.p., an inhibitor of tyrosine hydroxylase), or vehicle, once a day, for 4 consecutive days. On the third day, the animals were treated also with the infusion of *I. paraguariensis* (0.05 g/mL, in place of drinking water), or water and were tested in TST and FST 24 hours later (n=5-8).

Statistical analysis

Data were analyzed by one or two-way ANOVA, followed by Newman-Keuls's Post Hoc test when appropriate. Significance was considered when $p < 0.05$.

4.2.1.4 Results

I. paraguariensis reduces the MAO activity in vitro

I. paraguariensis inhibited both MAO-A ($F(6,20)=34.06$, $p<0.05$; Fig 1A) and MAO-B [$F(6,20)=46.49$, $p<0.05$; Fig 1B] isoforms at concentrations of 100 and 300 $\mu\text{g/mL}$ in a concentration-dependent manner. The IC_{50} was of $212.8 \pm 20.7 \mu\text{g/mL}$ and $223.2 \pm 13.6 \mu\text{g/mL}$ for MAO-A and MAO-B, respectively.

I. paraguariensis infusion does not modify the locomotor activity in the open-field test

Fig. 2 shows that the treatment of mice with different concentrations of *I. paraguariensis* infusion did not produce a significant change on locomotor or exploratory activity, neither after 24 hours nor 7 days of treatment, when was evaluated the crossing (Fig. 2A) and rearings (Fig. 2B) number, respectively.

I. paraguariensis infusion decreases the immobility time in the TST and FST

Fig 3A shows that the administration of *I. paraguariensis* infusion during 24 hours caused a significant decrease in the immobility time in TST after [$F(3,23)=4.68$, $p<0.05$]. However, this effect was not maintained when the administration of *I. paraguariensis* infusion occurred during 7 days.

When the animals were submitted to FST the treatment with *I. paraguariensis* infusion during 24 hours [$F(3,23)=7.75$, $p<0.05$; Fig. 3B] or 7 days [$F(3,23)=3.54$, $p<0.05$; Fig. 3B] decreased the immobility time when compared with control group at all tested concentrations.

I. paraguariensis does not alter MAO activity ex vivo

The table 1 shows that *I. paraguariensis* infusion did not produce any significant effect on MAO activity neither in *cortex* nor *hippocampus* after 7 days of treatment.

Treatment with 3-iodo-L-tyrosine or PCPA-pretreated mice modifies the effect of I. paraguariensis in the TST or FST

Two-way ANOVA demonstrated a significant interaction [$F(1,16)=10.68$, $p<0.05$; Fig. 4A] between the pretreatment of mice with the inhibitor of tyrosine hydroxylase, 3-iodo-L-tyrosine on TST. However, any effect was observed when the animals were treated with PCPA, the inhibitor of tryptophan hydroxylase, and/or *I. paraguariensis* (Fig. 4B).

When the animals were submitted to FST, the treatment of mice with *I. paraguariensis* reduced the immobility time [$F(3,31)=6.29$, $p<0.05$; Fig. 5A] and this effect was not altered by pretreatment with 3-iodo-L-tyrosine. By the other hand, two-way ANOVA demonstrated a significant interaction [$F(1,28)=16.65$, $p<0.05$; Fig. 5B) between the pretreatment of mice with PCPA on FST.

4.2.1.5 Discussion

The present study investigated if the antidepressant-like effect of *I. paraguariensis* infusion involves the monoaminergic system. It was demonstrated that the treatment with *I. paraguariensis* infusion at all tested doses decreased the immobility time on FST after 24 hours and 7 days of the treatment. In TST there was a reduction in the immobility time only at two minor doses tested after 24 hours of treatment. This reduction was not accompanied by changes in locomotor activity or MAO activity in cortex and hippocampus besides to causing a reduction of both MAO isoforms when tested *in vitro* at concentrations of 100 and 300 µg/mL. The effects of *I. paraguariensis* were prevented by 3-iodo-tyrosine in TST and PCPA in FST.

A previous study from our group showed the antidepressant-like effects of *I. paraguariensis* on FST in rats (Reis et al., 2014). Then we conducted the present study to extend the comprehension about the possible mechanisms by which *I. paraguariensis* is acting. Thus, our first aim was to evaluate the behavioral response of mice treated with different concentrations of *I. paraguariensis* infusion in TST and FST. It was demonstrated that the treatment with *I. paraguariensis* infusion at all tested doses decreased the immobility time on FST after 24 hours and 7 days of the treatment. In TST there was a reduction in the immobility time only at two minor doses tested after 24 hours of treatment without alterations 24 after the last day of treatment. The antidepressant-like activity of *I. paraguariensis* was also recently demonstrated Ludka et al., (2016) using an hydroalcoholic extract. The FST and TST are the most common animal models of the depression used for antidepressant screening (Cryan et al., 2005). Although, both tests are similar, they are different in terms of biological substrates that underlie the observed behavior (Sanchez 1997, Cryan et al., 2005). Additionally, different sensitivity to the reduction in the immobility time was observed to clinically used antidepressant (Cryan et al., 2005) as exemplified by selective inhibitors of serotonin reuptake which demonstrate better effects in TST than FST (Cryan et al., 2002). In both tests, the animals are placed in an inescapable situation and the antidepressant activity is expressed by a decrease of the immobility time (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). The beverages prepared with *I. paraguariensis* under hot water are known by its stimulant properties due to the presence of caffeine (Bastos et al., 2007; Heck and De Mejia, 2007). Thus, we evaluated the locomotor activity of the animals in an open field arena to exclude a false positive effect in TST or FST. However, *I. paraguariensis* infusion did not produce any significant influence on number of crossings or rearings. It is known that *I. paraguariensis*

infusion presents constituents as rutin and quercetin (Butterweck et al., 2003; Machado et al., 2008) which could be contributing to antidepressant-like activity.

A dysregulation of the neurotransmitters serotonin, noradrenaline and dopamine in the CNS has been suggested to play a role in the pathogenesis of depression (Di Giovanni et al., 2016). In this context, MAO enzyme catalyzes the oxidative deamination of a range of monoamines including serotonin, histamine, dopamine, noradrenaline and adrenaline. Two isoenzymes, MAO-A and MAO-B, are present in most mammalian tissues (Finberg and Rabey, 2016). MAO-A is inhibited by low concentrations of clorgyline and catalyzes the oxidation of serotonin, whereas MAO-B is inhibited by low concentrations of *l*-deprenyl and is active towards benzylamine and 2-phenylethylamine (Youdim and Bakhle., 2006). Literature data shows that natural compounds that present antidepressant-like effect have this activity in part through the inhibition of monoamine oxidase (Chhillar and Dingra, 2013; Xu et al., 2016; Nabavi et al., 2017). Furthermore, some compounds which are present in the *I. paraguariensis* infusion also presented effects on MAO activity (Sloley et al., 2000; Yoshino et al., 2011; Chhillar and Dingra, 2013). Then, we carried out an *in vitro* assay to evaluate the effects of the *I. paraguariensis* on MAO activity. The extract inhibited both MAO isoforms at concentrations of 100 and 300 µg/mL. However, when we investigated the MAO participation on antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis ex vivo*, the treatment did not produce a significant effect on MAO activity in *hippocampus* and *cortex* in any dose tested. As the necessary concentrations to inhibit the MAO activity *in vitro* were too high we believe that it is impossible for the compounds to reach these high concentrations in CNS. However, considering the form that population ingests this beverage, it is possible to act near concentrations in gastrointestinal tract which could be associated to cardiovascular events (Fernandes et al., 2012) that are attributed to *I. paraguariensis*. However, it needs further investigation.

As alterations in MAO activity does not seem to be responsible for the antidepressant-like effects of *I. paraguariensis* infusion, we investigated other mechanisms which could be involved in this effect by using pharmacological agents, 3-iodo-L-tyrosine or PCPA. Considering that the concentration of 0.05 g/mL of *I. paraguariensis* infusion reduced the immobility time in TST and FST, we used only this concentration for the next experiments.

The monoamine depletion paradigm has been successfully used to investigate the mechanism of action of antidepressants in preclinical and clinical studies (Booij et al., 2003; Machado et al., 2007; Kaster et al., 2007; O'Leary et al., 2007). In this context, PCPA is an inhibitor of the tryptophan hydroxylase that is rate-limiting step of serotonin synthesis. PCPA

treatment produces partial but highly significant reductions on brain serotonin levels while noradrenaline and dopamine levels are not affected (Redrobe et al., 1998 a,b). The neurotransmitter noradrenaline has also been involved in the pathogenesis of depression and in the mechanisms of antidepressants (Kurita, 2016). Noradrenaline and dopamine share common pathway in their synthesis, where they are synthesized from the same precursor that is converted inside the nervous terminals by tyrosine hydroxylase, the rate-limiting of the synthesis (Elhwuegi, 2004). Thus, in our study we investigated whether the pretreatment of mice with inhibitors of serotonin (PCPA) or noradrenaline and dopamine (3-iodo-L-tyrosine) synthesis inhibitors could avoid the antidepressant-like effect of *I. paraguariensis* in the TST and FST. The pretreatment with PCPA prevent the reduction of the immobility time in FST, but not in TST. On the other hand, we observed that pretreatment with 3-iodo-L-tyrosine prevented the reduction in the immobility time in TST. However, this effect was not observed in FST. These data suggest that *I. paraguariensis* affects the monoaminergic neurotransmission which could be associated to antidepressant-like effects.

Taken together, the present finding suggest that the *I. paraguariensis* exerts antidepressant-like effect in TST and FST. In addition, this study provides evidence for the involvement of the monoaminergic system but without alterations in MAO activity in the antidepressant-like effect of *I. paraguariensis*. However, additional studies are needed to better understand the mechanisms involved in the effects of *I. paraguariensis*.

Acknowledgments

This work has been supported by FAPERGS (PqG - 2080-2551/13-5-1) and CNPq (Universal - 475210/2013-1). R.F. has received fellowship from CNPq. E.M.R., A.B., C.M.F., A.P.C.C. and P.R. are recipient of fellowships from CAPES.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

4.2.1.6 References

Bastos DHM, De Oliveira DM, Matsumoto RLT, Ribeiro ML (2007). Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. *Med Arom Plant Scie and Biotechnol* **1**:37–46.

- Belmaker R H, Agam G (2008). Mechanisms of disease: major depressive disorder. *N Eng J Med* **358**:55-68.
- Booij L, Van Der Does AJ, Riedel WJ (2003). Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. *Mol Psychiatry* **8**: 951–973.
- Bracesco N, Sanchez A G, Contreras V, Menini T, Gugliucci A (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol* **136**:378-384.
- Broadhurst PL (1960). Experiments in psychogenetics In: *Experiments in personality*. Eysenk HJ (editor). London: Routledge & Kegan Paul; pp. 76.
- Butterweck V, Christoffel V, Nahrstedt A, Petereit F, Spengler B, Winterhoff H (2003). Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. *Life Sci*. **20**: 627-39.
- Colpo G, Trevisol F, Teixeira AM, Fachinetto R, Pereira RP, Athayde ML et al. (2007). *Ilex paraguariensis* has antioxidant potential and attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and memory dysfunction in rats. *Neurotox Res* **12**:171-180.
- Cramer H, Anheyer D, Lauche R, Dobos G (2017). A systematic review of yoga for major depressive disorder. *J Affect Disord* **213**:70-77.
- Chhillar R, Dhingra D (2013). Antidepressant-like activity of gallic acid in mice subjected to unpredictable chronic mild stress. *Fundam Clin Pharmacol* **27**:409-418.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* **23**:238-245.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* **29**:571–625.
- De Freitas CM, Busanello A, Schaffer LF, Peroza L1, Krum BN, Leal CQ, et al, (2016). Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **233**:457-467.
- De Oliveira D R, Schaffer L F, Busanello A, Barbosa C P, Peroza L R, De Freitas C M, et al (2015). Silymarin has antioxidant potential and changes the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and monoamine oxidase *in vitro*. *Ind Crops Prod* **70**: 347-355.
- Di Giovanni G, Svob Strac D, Sole M, Unzeta M, Tipton KF, Mück-Šeler D, et al (2016). Monoaminergic and Histaminergic Strategies and Treatments in Brain Diseases. *Front Neurosci* **24** 10:541.
- Elhwuegi A S (2004) Central monoamines and their role in major depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* **28**:435-451.

- Fernandes ES, Machado MDeO, Becker AM, de Andrade F, Maraschin M, Da Silva EL (2012). Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: In vitro and in vivo studies. *Nutrition* **28** :1157–1164.
- Finberg JP, Rabey JM (2016). Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. *Front Pharmacol* **7**:340.
- Heck CI, De Mejia EG (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*), a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci* **72**:138–151.
- Kaster MP, Raupp I, Binfaré RW, Andreatini R, Rodrigues AL (2007). Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. *Eur J Pharmacol* **565**:119–124
- Kessler RC (2012). The costs of depression. *Psychiatr Clin North Am* **35**:1–14.
- Kurita M (2016). Noradrenaline plays a critical role in the switch to a manic episode and treatment of a depressive episode. *Neuropsychiatr Dis Treat* **20**:2373-2380.
- Ludka FK, Tandler Lde F, Kuminek G, Olescowicz G, Jacobsen J, Molz S (2016) *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract exerts antidepressant-like and neuroprotective effects: involvement of the NMDA receptor and the L-arginine-NO pathway. *Behav Pharmacol* **27**:384-392, 2016
- Machado DG, Bettio LE, Cunha MP, Santos AR, Pizzolatti MG, Brighente IM (2008). Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol*. **10**:163-168.
- Machado DG, Kaster MP, Binfaré RW, Dias M, Santos AR, Pizzolatti MG, et al (2007). Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* **31**, 421–428.
- Matsumoto T, Suzuki O, Furuta T, Asai M, Kurokawa Y, Nimura Y, et al (1985). A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. *Clin Biochem* **18**: 126-129.
- Nabavi SM, Daglia M, Braidy N, Nabavi SF (2017) Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: a short review. *Nutrit Neurosc* **20**:180-194.
- O'Leary OF1, Bechtholt AJ, Crowley JJ, Hill TE, Page ME, Lucki I (2007). Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology* **192**: 357–371.
- Porsolt R.D, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**, 730–732.

Prediger RD, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, et al. (2008). Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol* **120**:465–473.

Redrobe JP, Bourin M, Colombel MC, Baker GB (1998a). Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology* **138**:1–8.

Redrobe JP, Bourin M, Colombel MC, Baker GB (1998b). Psychopharmacological profile of the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. *J Psychopharmacol* **12**: 348–355.

Reis Ede M, Schreiner Neto FW, Cattani VB, Peroza LR, Busanello A, Leal CQ (2014). Antidepressant-like effect of *Ilex paraguariensis* in rats. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/958209.

Rodrigues AL, da Silva GL, Mateussi AS, Fernandes ES, Miguel OG, Yunes RA, et al, (2002). Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci* **70**, 1347–1358.

Sanchez, C (1997). Acute stress enhances anxiolytic-like drug responses of mice in a black and white test box. *Eur Neuropsychopharmacol* **7** :283–288.

Sloley BD, Urichuk LJ, Morley P, Durkin J, Shan JJ, Pang PK, Coutts RT (2000). Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential Neuroprotectant in extracts of Ginkgo biloba leaves. *J Pharm Pharmacol* **52**:451-9.

Steru L, Chermat, R, Thierry B, Simon P (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* **85**, 367–370.

Thachil AF, Mohan R, Bhugra D (2007). The evidence base of complementary and alternative therapies in depression. *J Affect Disord* **97**:23–35.

Xu Y, Zhang C, Wu F, Xu X, Wang G, Lin M, et al, (2016). Piperine potentiates the effects of trans-resveratrol on stress-induced depressive-like behavior: involvement of monoaminergic system and cAMP-dependent pathway. *Metab Brain Dis* **31**:837-848.

Yoshino S, Hara A, Sakakibara H, Kawabata K, Tokumura A, Ishisaka A et al, (2011). Effect of quercetin and glucuronide metabolites on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. *Nutrition* **27**:847-852.

Youdim MB, Bakhle YS (2006) Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br J Pharmacol* **147**, 287–296.

Wong M, Licinio J (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* **2**:343-351.

Figure 1

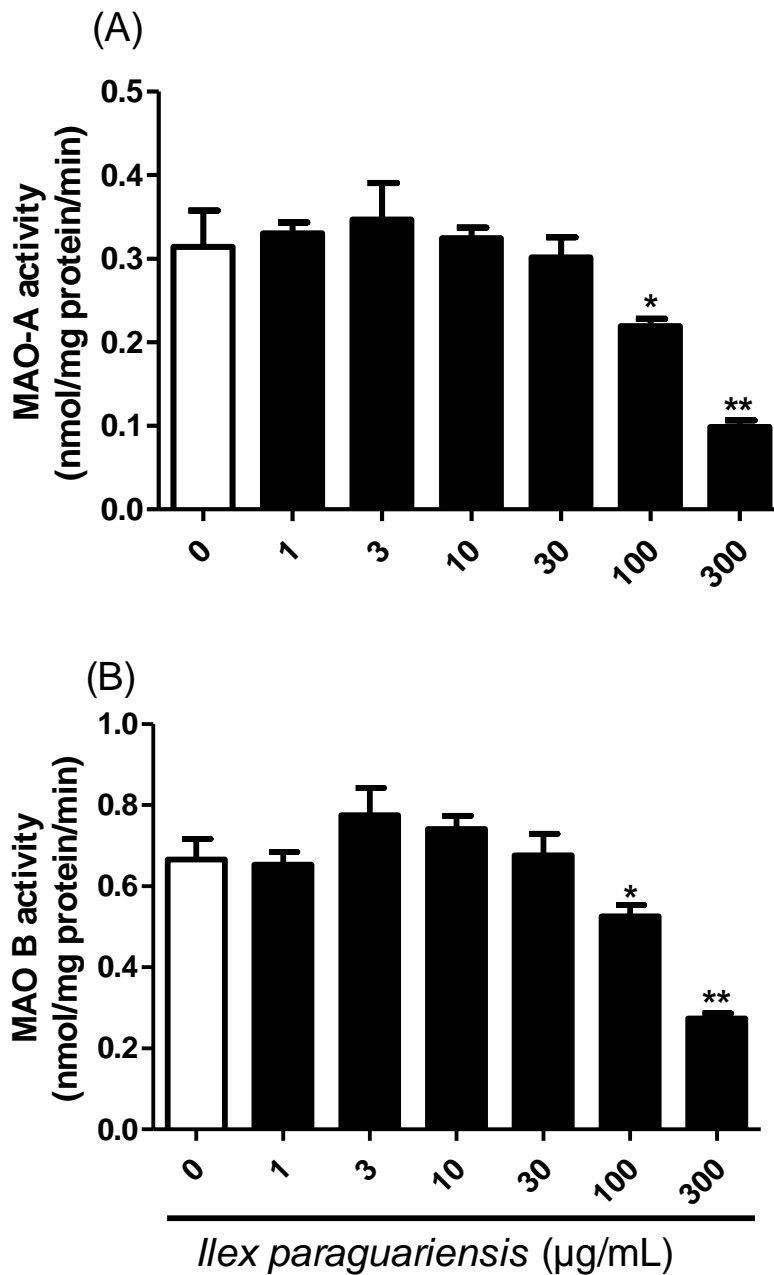


Figure 1: Inhibitory potential of *I. paraguariensis* on *in vitro* (A) MAO-A and (B) MAO-B activities in preparations of mice brain. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls's test. *, ** Significant differences from all other groups. The IC_{50} was of $212.8 \pm 20.7 \mu\text{g/mL}$ and $223.2 \pm 13.6 \mu\text{g/mL}$ for MAO-A and MAO-B, respectively

Figure 2

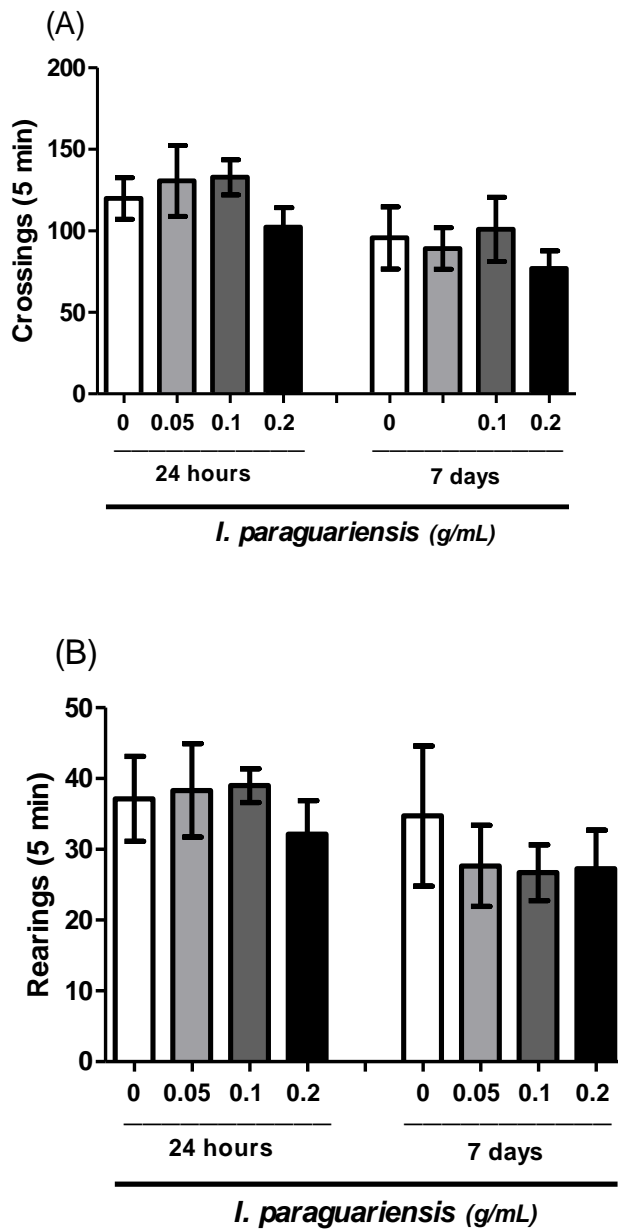


Figure 2: Effects of *I. paraguariensis* in the open field test in mice after 24 hours or 7 days of treatment (24 hours after the *I. paraguariensis* withdrawal). (A) Number of crossings and (B) rearing in 5 min. Values of number of crossings and rearing are represented by means \pm S.E.M of 5-7 animals per group.

Figure 3

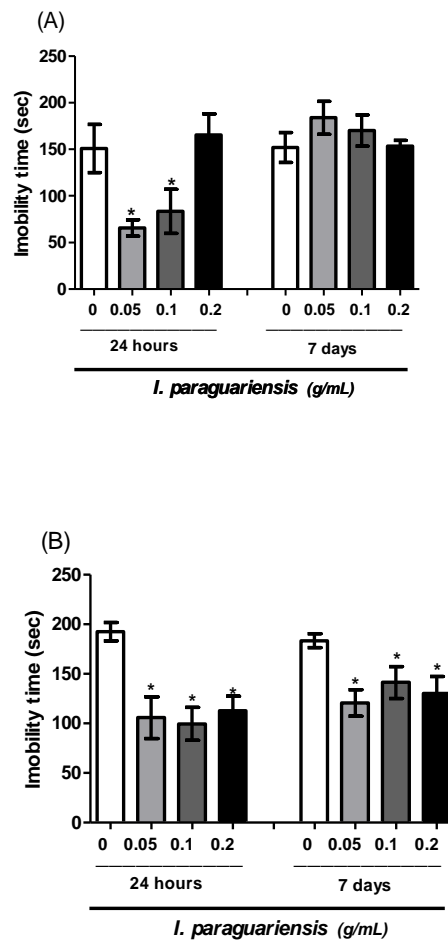


Figure 3: Effects of *I. paraguariensis* on immobility time in the TST during 6 min (A) and FST during 4 minutes (after 2 minutes to adaptation) (B) in mice after 24 hours or 7 days (24 hours after the *I. paraguariensis* withdrawal) of the orally consumption in place of water. Values are represented by means±S.E.M. of 5-7 animals per group; * $p < 0.05$ compared with control group.

Figure 4

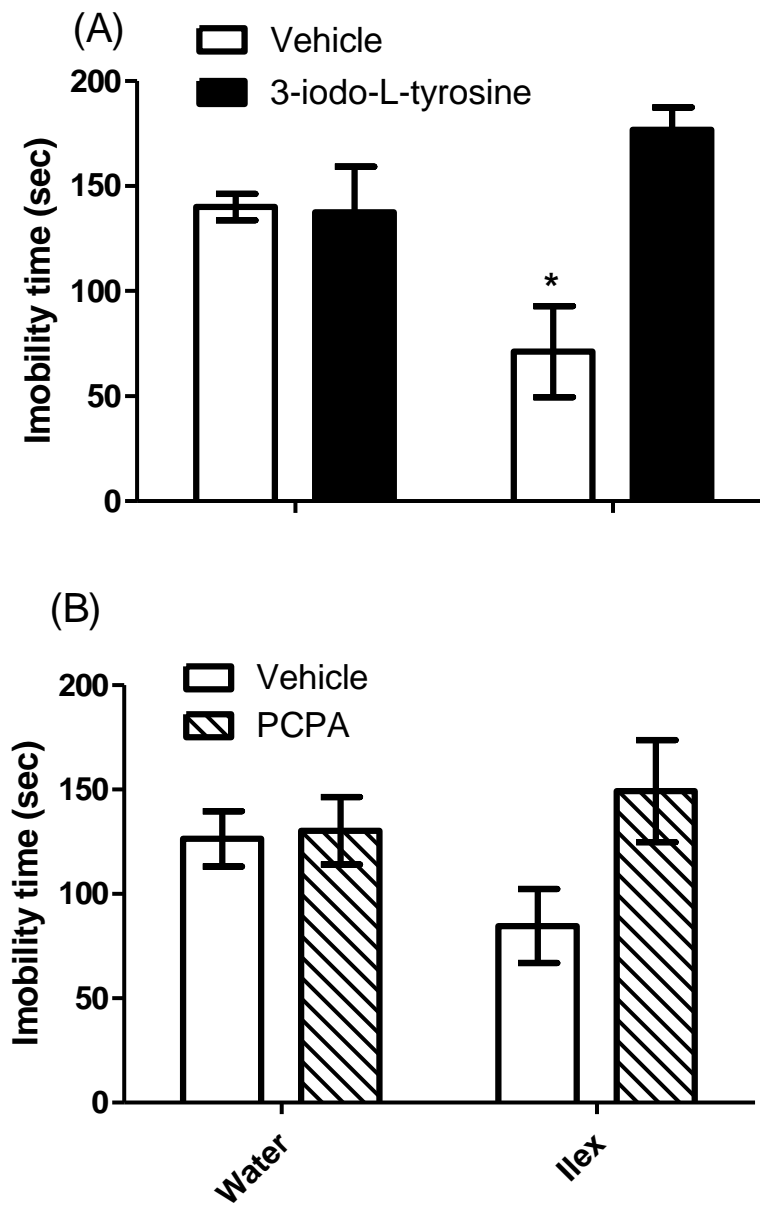


Figure 4: Effect of pretreatment with 3-iodo-L-tyrosine (A) or PCPA (B) on the *I. paraguariensis* effects in immobility time in the TST in mice. Values expressed by mean+S.E.M. of 5-8 animals per group. * $p < 0.05$ compared with all other groups.

Figure 5

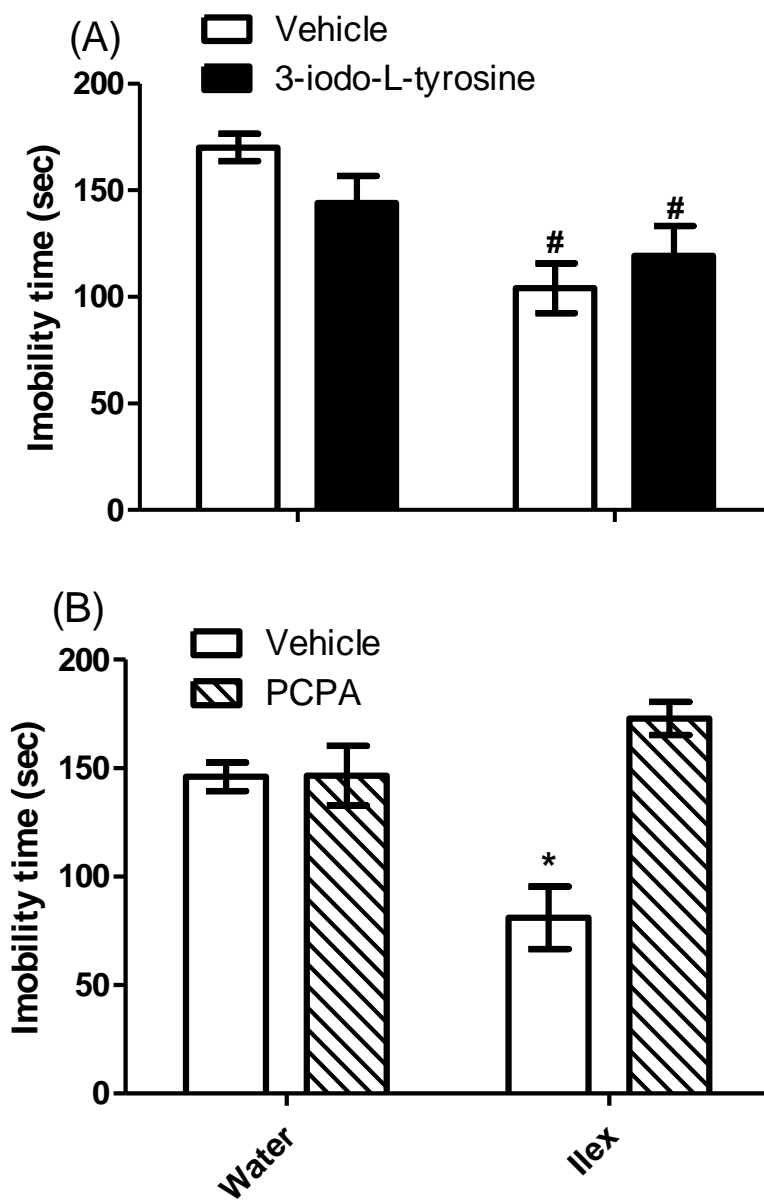


Figure 5: Effect of pretreatment with 3-iodo-L-tyrosine (A) or PCPA (B) on the *Ilex paraguariensis* effects in immobility time in the FST in mice. Values expressed by mean+S.E.M. of 5-8 animals per group. * $p < 0.05$ compared with all other groups; # $p < 0.05$ compared with control.

Table 1: Effect of *Ilex paraguariensis* infusion on *ex vivo* MAO-A and MAO-B activities in brain homogenates. Values are represented by means±S.E.M (n=5).

	MAO-A	MAO-B
	(nmol/mg protein/min)	
<i>Hippocampus</i>		
Control	0.0619±0.0082	0.1175±0.0156
<i>I.paraguariensis</i> 0.05 g/mL	0.0730±0.0071	0.1314±0.0068
<i>I.paraguariensis</i> 0.1 g/mL	0.0723±0.0083	0.1260±0.0093
<i>I.paraguariensis</i> 0.2 g/mL	0.0625±0.0072	0.1086±0.0128
<i>Cortex</i>		
Control	0.0866±0.0077	0.1074±0.0010
<i>I.paraguariensis</i> 0.05 g/mL	0.0916±0.0052	0.1137±0.0014
<i>I.paraguariensis</i> 0.1 g/mL	0.0856±0.0083	0.1143±0.0013
<i>I.paraguariensis</i> 0.2 g/mL	0.0898±0.0062	0.1137±0.0013

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar o possível efeito tipo antidepressivo da infusão de *I. paraguariensis*, também conhecida como erva-mate e se este efeito envolve alterações no status oxidativo e/ou monoaminérgico.

A depressão é uma doença que acomete uma grande parte da população mundial, podendo ser classificada em subtipos entre eles, distímia e depressão maior. A distímia é definida como uma condição leve e crônica com duração de pelo menos dois anos, já a depressão maior é uma forma grave, associada a prejuízos na funcionalidade e altas taxas de hospitalização (VON WOLFF et al., 2012). A hipótese mais aceita para explicar a patologia da depressão tem sido a disfunção do sistema monoaminérgico, o qual envolve a DA, a 5-HT e a NA. Baseado nesta hipótese, os fármacos utilizados para o tratamento da depressão, os AD, são agrupados em diferentes classes de acordo com seu mecanismo de ação, exemplos: inibidores seletivos e não seletivos da recaptção de 5-HT, os IMAO, ADT e AD atípicos (BELMAKER; AGAM, 2008).

Apesar da melhora na terapia antidepressiva dois problemas ainda possuem grande destaque: intervalo entre o início de tratamento e a melhora nos sintomas e a resposta parcial ou falta da mesma em parcela considerável de pacientes, gerando a uma busca por AD novos e mais eficazes (DI GIOVANNI et al., 2016). As falhas no tratamento impulsionam a busca por novas opções terapêuticas a serem aliadas ao tratamento farmacológico, como a psicoterapia e Yoga (CRAMER et al., 2017). Além disso, a medicina natural tem ganhado destaque, onde pode-se citar o *H. perforatum* que vem sendo usado com sucesso em formas leves e moderadas de depressão (MAHER et al., 2016). Porém, devido às interações medicamentosas, seu uso possui restrições (RUSSO et al., 2014).

Neste trabalho foi demonstrado o efeito tipo antidepressivo do extrato aquoso de *I. paraguariensis* através da redução do tempo de imobilidade no teste de nado forçado em ratos após 24 horas de tratamento (56%) e 4 semanas (28%) de tratamento. Também foi observada a redução do tempo de imobilidade no teste de nado forçado em camundongos tratados com 3 diferentes concentrações do extrato *I. paraguariensis* 0,05 g/mL (45%), 0,1 g/mL (48%) e 0,2 g/mL (41%) após 24 horas e 7 dias de tratamento (34%, 22% e 28%, respectivamente). Porém, no teste de suspensão da cauda em camundongos, apenas duas concentrações causaram redução no tempo de imobilidade: 0,05 g/mL (56%), 0,1 g/mL (45%) após 24 horas. O teste de nado forçado e suspensão da cauda são os modelos animais mais utilizados na triagem de novos antidepressivos, sendo que o teste de nado forçado pode ser

aplicado tanto para ratos como para camundongos, enquanto a suspensão da cauda apenas em camundongos (CRYAN et al., 2005). Em ambos os testes, os animais são colocados em uma situação inevitável e a atividade antidepressiva se dá pela diminuição do tempo de imobilidade (PORSOLT et al., 1977; STERU et al., 1985). Estes testes tem o mesmo princípio, porém apresentam diferente sensibilidade para diferentes classes de antidepressivos. ISRSs têm uma melhor detecção no teste de suspensão da cauda do que no teste de nado forçado. Já antagonistas GABA_A, apresentam efeito tipo antidepressivo no teste de nado forçado e não no teste de suspensão da cauda (CRYAN et al., 2005).

O extrato aquoso foi obtido através da infusão das folhas secas de *I. paraguariensis* comercializadas em pacotes nos supermercados. No primeiro estudo, uma alíquota do extrato foi utilizada para determinação do perfil fitoquímico, indicando a presença de componentes como cafeína, rutina, quercetina, ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, teobromina e kaempferol. A presença de flavonoides reforça nossos achados, uma vez que estudos demonstram que a atividade antidepressiva do *H. perforatum* é atribuída a presença de flavonoides, como a rutina (BUTTERWECK et al., 2000; NÖLDER; SCHÖTZ, 2002).

Tendo em vista que a cafeína apresenta efeito psicoestimulante o que poderia levar ao aumento na atividade locomotora dos animais (GLADE, 2010) promovendo um efeito falso positivo nos testes para efeito tipo antidepressivo, foi avaliada a atividade locomotora dos animais através do teste de campo aberto. Não foram observadas alterações locomotoras representadas pelo número de cruzamentos em ratos e camundongos, porém foi observada uma diminuição significativa no número de levantamentos apenas em ratos. A cafeína, pode ter efeito sob atividade locomotora, porém não apresenta controle central sob a atividade vertical (NEHLIG et al., 1992), sugerindo que outros componentes da infusão podem influenciar o número de levantamentos. Também avaliamos em ratos o possível efeito ansiogênico/ansiolítico de *I. paraguariensis*, uma vez que constituintes estimulantes, como a cafeína podem ser ansiogênicos, e alguns agentes antidepressivos podem apresentar propriedades ansiolíticas (DE ANGELIS, 1996; EROGLU; GÖVEN, 1998) porém não foram observadas alterações no teste de labirinto em cruz elevada. Considerando os resultados obtidos no teste do campo aberto e do labirinto em cruz elevado, acreditamos que a concentração de cafeína presente na infusão não foi suficiente para causar efeitos ansiogênicos ou estimulantes e desta forma acreditamos que o efeito tipo antidepressivo deva-se à presença de outros componentes da infusão que não a cafeína.

A atividade tipo antidepressiva de muitos compostos naturais, chá verde, resveratrol e *H. perforatum*, é atribuída a inibição da MAO (BUTTERWECK, 2003; NABAVI et al.,

2015). A MAO é a enzima responsável pela desaminação oxidativa de diversas aminas biogênicas, incluindo os neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina (YOU DIM; BAKHLE, 2006). A inibição da MAO promove o aumento da concentração de MA e este é um importante alvo na terapia antidepressiva. Os inibidores da MAO foram os primeiros antidepressivos a serem utilizados na terapia antidepressiva, porém devido a seus graves efeitos colaterais foram rapidamente substituídos por fármacos mais novos. Apesar da primeira geração de inibidores da MAO irreversíveis e não seletivos apresentar atividade antidepressiva, seu uso levava uma série de efeitos colaterais, como as crises hipertensivas agudas quando ingeridos juntamente com alimentos ricos em tiramina (YOU DIM; WEINSTOCK, 2004). Nos últimos anos, inibidores seletivos da MAO-A com perfil reversível (por exemplo, moclobemida) têm sido desenvolvidos na tentativa de fornecer fármacos com um melhor perfil de segurança. Recentemente, a selegilina, um inibidor irreversível da MAO-B, tem sido utilizada com sucesso em pacientes com depressão sob a forma farmacêutica transdermal, evitando assim interações alimentares (PAE et al., 2012; THASE, 2012).

O extrato liofilizado de *I. paraguariensis* demonstrou inibir a enzima MAO em testes *in vitro* nas concentrações de 100 e 300 µg/mL. Porém, a inibição da enzima MAO não foi observada em ratos e camundongos tratados quando o experimento foi realizado *ex vivo*. Acreditamos que como as concentrações necessárias para inibir a MAO *in vitro* foram relativamente altas, seria difícil de os compostos responsáveis por tal ação atingirem concentrações suficientes para inibir a MAO no SNC dos animais tratados. Porém, não descarta se a possibilidade da ocorrência desta inibição a nível de TGI, uma vez que as concentrações atingidas neste local são bem superiores às do SNC. De fato, alguns efeitos cardiovasculares são descritos para a erva-mate, tais como taquicardia juntamente com insônia e irritação estomacal (FERNANDES et al., 2012). No entanto, se a inibição da MAO a nível de TGI está envolvida nestes efeitos ainda carece de investigação.

Os produtos da reação catalisada pela MAO são capazes de gerar espécies reativas, quando esses produtos não são metabolizados pelo sistema de defesa antioxidante ocorre a formação de espécies reativas, tornando assim a MAO neurotóxica. O desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas leva ao dano oxidativo (ALUF et al., 2011; JENNER, 2003).

O dano oxidativo tem sido implicado na fisiopatologia de várias doenças neuropsiquiátricas, incluindo a depressão e distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Parkinson e Alzheimer (BILICI et al., 2001; KHANZODE et al., 2003, REIS et al., 2013).

Neste estudo foram avaliados os níveis de peroxidação lipídica, tióis e de vitamina C, porém não foram, demonstradas alterações significativas nestes parâmetros de estresse oxidativo analisados. Neste contexto, foram demonstrados efeitos da *I. paraguariensis* sobre a memória de ratos tratados com haloperidol que foram atribuídos à modulação indireta de estresse oxidativo (COLPO et al., 2007), embora sem que ocorressem alterações significativas nos parâmetros de estresse oxidativo. Tem sido demonstrado que dependendo da dose compostos antioxidantes podem se tornar pro-oxidantes, tornando-se tóxicos e influenciando no equilíbrio redox de enzimas importantes (CHOE et al., 2003), como por exemplo a MAO que catalisa a degradação de monoaminas.

As MA são neurotransmissores, suas funções e mecanismos variam de acordo com sua distribuição e interação com diferentes receptores no SNC. Ao mesmo tempo as MA estão relacionadas a fisiopatologia de vários distúrbios mentais. A DA, por exemplo, está envolvida na esquizofrenia, uma vez que a maioria dos antipsicóticos tem como mecanismo de ação o bloqueio de receptores dopaminérgicos. Já a 5-HT têm sido associada a transtornos de ansiedade e pânico. A disfunção de MA têm sido a hipótese mais aceita para depressão. Atualmente, o tratamento para depressão baseia-se no aumento da transmissão serotoninérgica e/ou dopaminérgico/noradrenérgica por diferentes mecanismos (ELHWUEGI, 2004).

A depleção de monoaminas tem sido utilizada com sucesso para investigar os mecanismos associados ao efeito antidepressivo de drogas em estudos pré-clínicos e clínicos (BOOIJ et al., 2003; KASTER et al., 2007; MACHADO et al., 2007; MILLER et al., 1996a, b; O'LEARY et al., 2007). Ludka et al. (2016), demonstrou que o extrato hidroalcolico de *I. paraguariensis* apresentou efeito tipo antidepressivo e neuroprotetor envolvendo os receptores N-metil-D-aspartato e vias L-arginina/óxido nítrico. Neste contexto, utilizamos em nosso estudo utilizamos éster metílico p-clorofenilalanina metil (PCPA), um inibidor da triptofano hidroxilase e a 3-iodo-L-tirosina, um inibidor da tirosina hidroxilase, para investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico e/ou dopaminérgico/noradrenérgico. Foram realizados testes preliminares com três diferentes concentrações de extrato aquoso de *I. paraguariensis* 0,05; 0,1, 0,2g/mL. A redução do tempo de imobilidade foi observada nas três concentrações no teste de nado forçado após 24 horas e 7 dias de tratamento, porém a foi observada redução no teste de suspensão da cauda foi observada apenas após 24 horas de tratamento nas concentrações de 0,05 e 0,1 g/mL. Com base neste experimentos, foi escolhida a concentração de 0,05 g/mL de *I. paraguariensis* para dar continuidade ao estudo, uma vez que esta concentração apresentar uma redução no tempo de imobilidade no testes realizados, sem alterações no consumo e na atividade locomotora.

Foi avaliada a participação do sistema noradrenérgico no efeito tipo antidepressivo de *I. paraguariensis*, uma vez que o neurotransmissor NA tem sido implicado na patogênese da depressão bem como na terapia antidepressiva. A geração de antidepressivos tricíclicos visa melhorar a concentração sináptica de noradrenalina. A tirosina é a enzima limitante na síntese de NA e DA (ELHWUEGI, 2004). Mayorga et al. (2001) demonstrou que α -metil-p-tirosina (AMPT) na dose 100 mg/kg, um inibidor da tirosina hidroxilase, reduz os níveis de NA e DA sem interferir nos níveis de 5-HT. Outro estudo utilizando a mesma dose, demonstrou que a mesma dose de AMPT preveniu a ação antidepressiva da lamotrigina no teste de natação forçada (KASTER et al., 2007). Demonstrando que inibição da tirosina hidroxilase pode ser utilizada para investigação de mecanismos relacionados a DA e NA. O pré-tratamento com 3-iodo-L-tirosina, 100mg/kg, foi capaz de impedir a redução de imobilidade causada pelo tratamento com *I. paraguariensis* no teste de suspensão da cauda, sugerindo que o sistema dopaminérgico/noradrenérgico pode estar envolvido nos efeitos de *I. paraguariensis*.

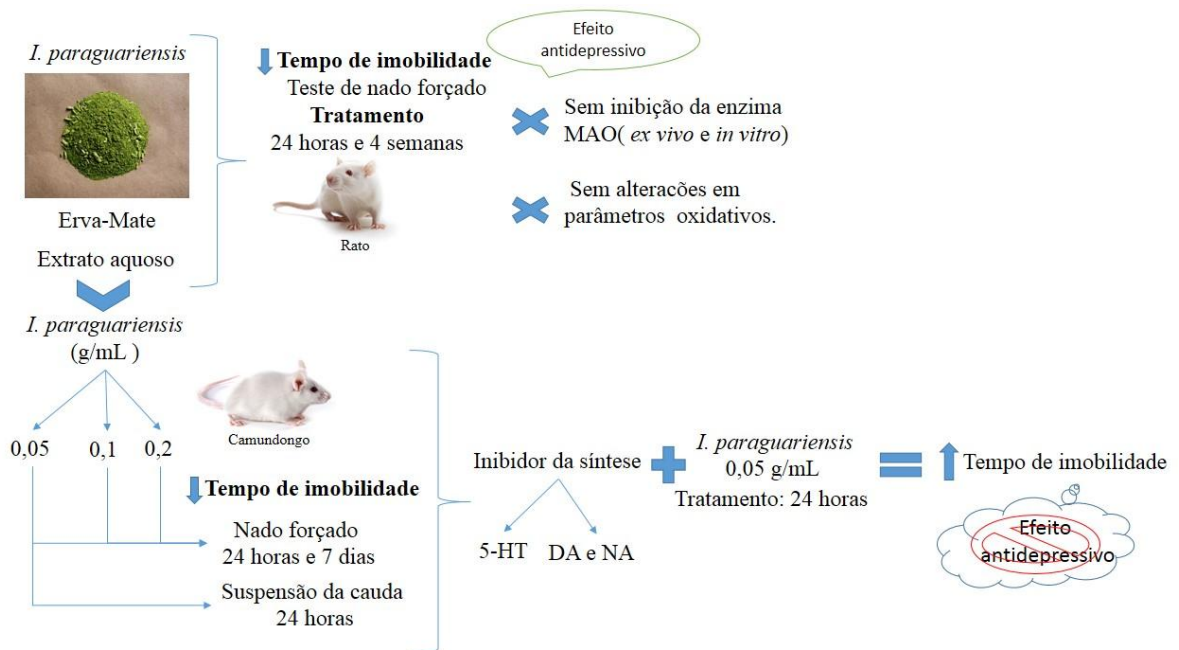
Por outro lado, para avaliar a participação do sistema serotoninérgico, foi utilizado o PCPA por causar uma depleção parcial de serotonina, sem reduzir os níveis significativamente, além de não afetar a síntese de dopamina ou noradrenalina (REDROBE et al., 1998). Além disso, estudo realizado por Rodrigues et al. (2002) mostrou que o tratamento com PCPA é capaz de prevenir a ação de antidepressiva da fluoxetina, um ISRS, sem afetar a ação da imipramina, um antidepressivo tricíclico. O pré-tratamento com PCPA foi capaz de impedir a redução do tempo de imobilidade causado pelo tratamento com *I. paraguariensis* no teste de nado forçado, sugerindo o envolvimento do sistema serotoninérgico no seu efeito tipo antidepressivo.

A literatura tem descrito uma série de efeitos de *I. paraguariensis*, desta forma, nosso estudo contribuiu demonstrando mais um efeito associado a esta planta, seu o potencial efeito antidepressivo. Terapias complementares vêm ganhando destaque no tratamento da depressão, compostos naturais, como *H. perforatum*, são utilizados em casos leves a moderados de depressão. Através deste estudo, podemos demonstrar o envolvimento do sistema monoaminérgico no potencial efeito antidepressivo de *I. paraguariensis*, sistema este amplamente relacionado a fisiopatologia da depressão e alvo da terapia antidepressiva, sugerindo assim o possível uso de *I. paraguariensis* como um aliado ao tratamento da depressão.

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou o potencial efeito antidepressivo de *I. paraguariensis* em diferentes modelos animais utilizando roedores. Inicialmente, os dados indicaram a redução do tempo de imobilidade no teste de nado forçado em ratos tratados com o extrato aquoso de *I. paraguariensis* durante 24 horas e 4 semanas, sugerindo um efeito antidepressivo. O extrato aquoso de *I. paraguariensis* preparado segundo a forma tradicional de consumo, o chimarrão, não apresenta influência significativa em parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade avaliados em ratos e na atividade locomotora de ratos e camundongos. Em uma segunda etapa, a realização de testes em camundongos reforçou o potencial efeito antidepressivo e o pré-tratamento com diferentes inibidores da síntese MA foi capaz de elucidar o envolvimento do sistema monoaminérgico neste efeito. Além disso, os dados sugerem a falta de envolvimento da inibição enzima MAO e alterações em parâmetros oxidativos no potencial efeito antidepressivo de *I. paraguariensis*.

Figura 3 – Resumo esquemático



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLES, A.; ENGELHARDT, S. Polymorphic variants of adrenoceptors: pharmacology, physiology, and role in disease. **Pharmacol. Rev.**, v. 66, n. 3, p. 598-637, 2014.
- ALI, S. H. et al. Resveratrol ameliorates depressive-like behavior in repeated corticosterone-induced depression in mice. **Steroids.**, v. 101, p. 37-42, 2015.
- ALUF, Y. et al. Alterations in striatal oxidative stress level produced by pharmacological manipulation of dopamine as shown by a novel synthetic marker molecule. **Neuropharmacology.**, v. 61, n. 1-2, p. 87-94, 2011.
- ANDERSEN, P. H. et al. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 11, p. 231-236, 1990.
- ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **J. Hum. Nutr. Dietet.**, v. 14, p. 243-250, 2001.
- BARABAN, J. M.; AGHAJANIAN, G. K. Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. **Neuropharmacology.**, v. 19, p. 355-363, 1980.
- BASTOS, D. H. M et al. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. **Med. Arom. Plant. Scie. and Biotechnol.**, v. 1, p. 37-46, 2007.
- BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 63, n. 1, p. 182-217, 2011.
- BEER, M. S.; MIDDLEMISS, D. N.; MCALLISTER, G. 5-HT₁-like receptors: six down and still counting. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v 14, p. 228-231, 1993.
- BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Mechanisms of disease: major depressive disorder. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, p. 55-68, 2008.
- BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 137-151, 2006.
- BILICI, M. et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J. Affect. Disord.**, v.64, p 43-51, 2001.
- BINDER, E. B.; NEMEROFF, C. B. The CRF system, stress, depression and anxiety-insights from human genetic studies. **Mol. Psychiatry.**, v. 15, p. 574-588, 2010.
- BOOIJ, L.; VAN DER DOES, A. J.; RIEDEL, W. J. Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. **Mol. Psychiatry.**, v. 8, p. 951-973. 2003.

BRACESCO, N. et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*, prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **J. Altern. Complement. Med.**, v. 9, p. 379-387, 2003.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **J. Ethnopharmacol.**, v. 136, p. 378-384, 2011.

BRANCO, C. S. et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain. Res. Bull.**, v. 92, p. 60-68, 2013.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, p. 397-415, 2012

BUTTERWECK, V. Mechanism of action of St John's wort in depression: What is known? **CNS Drugs.**, v. 17, p. 539-562, 2003.

BUTTERWECK, V. et al. Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. **Life Sci.**, v. 20, n. 73(5), p. 627-639, 2003a.

BUTTERWECK, V. et al. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Med.**, v. 66, p. 3-6, 2000.

CHOI, E. J; CHEE, K. M. LEE, B. H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. **Eur. Pharmacol.**, v. 482, n. 1-3, p. 281-285, 2003.

CIRANNA, L. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 2, p. 101-114, 2006.

COLPO, G. et al. *Ilex paraguariensis* has antioxidant potential and attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and memory dysfunction in rats. **Neurotox Res.**, v. 12, p. 171-180, 2007.

CRAMER, H. et al. A systematic review of yoga for major depressive disorder. **J. Affect. Disord.**, v. 7, n. 213, p. 70-77, 2017.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 29, p. 571-625, 2005.

DAWS, L. C. Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. **Pharmacol. Ther.**, v. 121, p. 89-99, 2009.

DE ANGELIS, L. Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 354, p. 379-383, 1996.

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL- cholesterol

reduction in individuals on statin therapy. **J. Agric. and Food Chem.**, v. 57, p. 8316-8324, 2009.

DENNIS, T. et al. Presynaptic alpha-2 adrenoreceptors play a major role in the effect of idazoxan on cortical noradrenaline release (as measured by in vivo dialysis) in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 241, p. 642-649, 1987.

DI GIOVANNI, G. et al. Monoaminergic and Histaminergic Strategies and Treatments in Brain Diseases. **Front. Neurosci.**, v. 24, n. 10, p. 541, 2016.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, p. 60-71, 2007.

EDMONDSON, D. E.; BINDA, C.; MATTEVI, A. Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 15, n. 464(2), p. 269-76, 2007.

EISENHOFER, G.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, p. 331-349, 2004.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 28, p. 435-451, 2004.

EROĞLU, L.; GÜVEN, Ö. The effects of moclobemide on the yohimbine-induced anxiogenic action in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Res.**, v. 37, p. 37-143, 1998.

FERNANDES, E. S. et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: In vitro and in vivo studies. **Nutrition.**, v. 28, p. 1157-1164, 2012.

FINBERG, J. P.; RABEY, J. M. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. **Front. Pharmacol.**, v. 18, n. 7, p. 340, 2016.

FINK, K. B.; GÖTHERT, M. 5-HT Receptor Regulation of Neurotransmitter Release. **Pharmacol. Rev.**, v. 59, p. 360-417, 2007.

FULLER, R. W. Pharmacology of central serotonin neurons. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 20, p. 111-127, 1980.

GLADE, M. J. Caffeine—not just a stimulant. **Nutrition.**, v. 26, n. 10, p. 932-938, 2010.

GNOATTO et al. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 771-782, 2008.

GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia.**, v. 80, p. 339-344, 2009b.

GUGLIUCCI, A. et al. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia.**, v. 80, p. 138-142, 2009a.

HALE, M. W.; LOWRY, C. A. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits **Psychopharmacology (Berl)**., v. 213, n. 2-3, p. 243-64, 2011.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*), a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J. Food. Sci.**, v. 72, p. 138-151, 2007.

IVERSON, L. L. **The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves** Cambridge Univ. Press, London, England. 1991.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, v. 53, n. 3, p. S26-36, 2003.

JOHNSTON, J. P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. **Biochem. Pharmacol.**, v. 17, p. 1286-1297, 1968.

KASTER, M. P. et al. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 565, p. 119-124, 2007.

KELTNER, N. L. et al. A. Biological perspectives: adrenergic, cholinergic, GABAergic, and glutaminergic receptor function in the CNS. **Perspect. Psychiatr. Care.**, v. 37, p. 140-146, 2001.

KEMPERMANN, G.; KRONENBERG, G. Depressed new neurons –adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biol. Psychiatry.**, v. 54, p. 499-503, 2003.

KHANZODE, S. D. et al. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Report.** v. 8, p. 365-370, 2003.

KÖHLER, S. et al. The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants. **J. Psychopharmacol.**, v. 30, n. 1, p. 13-22, 2016.

KRONENBERG G et al. Of mice and men: modelling post-stroke depression experimentally. **Br. J. Pharmacol.**, v. 171, p. 4673-4689, 2014.

KURITA, M. Noradrenaline plays a critical role in the switch to a manic episode and treatment of a depressive episode. **Neuropsychiatr. Dis. Treat.**, v. 20, n. 12, p. 2373-2380, 2016.

LEE, R. Ask the doctor. Is it true that drinking yerba mate can lower blood pressure and cholesterol? **Harv. Healt. Lett.**, v. 18, p. 8, 2007.

- LIGGETT, S. B. **Molecular basis of alpha2-adrenergic receptor subtype regulation by agonist.** In: Lanier, S., Limbird, L. (Eds.), *Alpha2-Adrenergic Receptors: Structure, Function and Therapeutic Implications.* Harwood Academic Publishers, Reading, UK, p. 113-121, 1996.
- LIMBERGER, N. et al. Autoreceptors and alpha2-adrenoceptors at the serotonergic axons of rabbit brain cortex. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 332, p. 324-331, 1986.
- LORIA, D.; BARRIOS, E.; ZANETTI, R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. **Rev. Panam. de Salud. Publica.**, v. 25, p. 530-539, 2009.
- LUDKA, F. K. et al. *Ilex paraguariensis* hydroalcoholic extract exerts antidepressant-like and neuroprotective effects: involvement of the NMDA receptor and the L-arginine-NO pathway. **Behav. Pharmacol.**, v. 27, n. 4, p. 384-92, 2016.
- MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.* **Biol. Psychiatry.**, v. 31, p. 421-428, 2007.
- MACHADO, D. G. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 10, n. 587(1-3), p. 163-8, 2008.
- MAES, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative and nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. **Neuroendocrinol. Lett.**, v. 29, p. 287-291, 2008.
- MAHER, A. R. et al. St. John's Wort for Major Depressive Disorder: A Systematic Review. **Rand. Health Q.**, v. 5, n. 4, p.12, 2016.
- MARTINET, A. et al. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochem. Anal.**, v. 12, p. 48-52, 2001.
- MASSON, J. et al. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. **Pharmacol. Rev.**, v. 51, p. 439-464, 1999.
- MAYORGA, A. J. et al. Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine1A and 5-hydroxytryptamine1B receptor mutant mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 298, p. 1101-1107, 2001.
- MAZZAFERA, P. MATÉ drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry.**, v. 60, n. 1, p. 67-71, 1997.
- MENINI, T. et al. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. **Planta Med.**, v. 73, p. 1141-1147, 2007.
- MILLAN, M. J. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. **Pharmacol. Ther.**, v. 110, p. 135-370, 2006.

- MILLER, H. L. et al. Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. **Arch. Gen. Psychiatry.**, v. 53, p. 117-128, 1996a.
- MILLER, H. L. et al. Effects of α -methyl-para-tyrosine (AMPT) in drug-free depressed patients. **Neuropsychopharmacology.**, v. 14, p. 151-157, 1996b.
- MIRANDA, D. D. et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis.**, v. 23, p. 261-265, 2008.
- MOSIMANN, A. L.; WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors.**, v. 26, p. 59-70, 2006.
- MYÖHÄNEN, T. T.; SCHENDZIELORZ, N.; MÄNNISTÖ, P. T. Distribution of catechol-O-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice. **J. Neurochem.**, v. 113, p. 1632-1643, 2010.
- NABAVI, S. M. et al. Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: a short review. **Nutrit. Neurosci.**, v. 3, p. 180-194, 2015.
- NEER, E. J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. **Cell.**, v. 80, p. 249-257, 1995.
- NEHLIG, A.; DAVAL, J. L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical metabolic and psychostimulant effects. **Brain. Resh. Rev.**, v. 17, p. 139-170, 1992.
- NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat. Neurosci.**, v. 5, p. 1068-1070, 2002.
- NJUS, D.; KELLEY, P. M.; HARDABEK, G. J. Bioenergetics of secretory vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 853, p. 237-265, 1986.
- NÖLDNER, M.; SCHÖTZ, K. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. **Planta Med.**, v. 68, p. 577-580, 2002.
- OFFERMANN, S. G-proteins as transducers in transmembrane signaling. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 83, p. 101-130, 2003.
- O'LEARY, O. F. et al. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. **Psychopharmacology.**, v. 192, p. 357-371, 2007.
- PAE, C. U et al. Safety of selegiline transdermal system in clinical practice: analysis of adverse events from postmarketing exposures. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 73, p. 661-668, 2012.

- PINTOS, J. et al. Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. **Epidemiology.**, v. 5, p. 583-590, 1994.
- PITTLER, M. H.; SCHMIDT, K.; ERNST, E. Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review. **Obes. Rev.**, v. 6, p. 93-111, 2005.
- PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature.**, v. 266, p. 730-732, 1977.
- PREDIGER, R. D. S. et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **J Ethnopharmacol.**, v. 120, p. 465-473, 2008.
- RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutat. Res.**, v. 554, p. 53-65, 2004.
- RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 557-574, 2007.
- REDROBE, J. P. et al. 1998. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. **Psychopharmacology.**, v. 138, p. 1-8, 1988.
- REIS, E. M. et al. Effect of *Hypericum perforatum* on different models of movement disorders in rats. **Behav. Pharmacol.**, v. 24, p. 623-627, 2013.
- RODRIGUES, A. L. S. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.**, n. 70, p. 1347-1358, 2002.
- RUSSO, E. et al. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions. **Phytother. Res.**, v. 5, p. 643-655, 2014.
- SEWRAM, V. et al. Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 12, p. 508-513, 2003.
- SOKOLOFF, P. et al. The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets.**, v. 5, p. 25-43, 2006.
- STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology.**, n. 85, p. 367-370, 1985.
- SUZUKI, O. et al. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. **Planta Med.**, v. 50, p. 272-274, 1984.
- THASE, M. E. The role of monoamine oxidase inhibitors in depression treatment guidelines. **J. Clin. Psychiatry.**, v. 73, p. 1-10, 2012.

TORRES, G. E.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 4, n. 1, p. 13-25, 2003.

VOLETI, B.; DUMAN, R.S. The roles of neurotrophic factor and Wnt signaling in depression. **Clin. Pharmacol. Therapeut.**, v. 91, p. 333-338, 2012.

VON WOLFF, A. et al. Combination of pharmacotherapy and psychotherapy in the treatment of chronic depression: a systematic review and meta-analysis. **BMC Psychiatry.**, v. 12, p. 61, 2012.

WANG, Z. et al. Antidepressant-like activity of resveratrol treatment in the forced swim test and tail suspension test in mice: the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of ERK. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 112, p. 104-110, 2013

WESTLUND, K. N. et al. Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. **Science.**, v. 250, p. 181-183, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression.** 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>>. Acesso em: 22 abr. 2017.

YOUDIM, M. B.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, p. 287-296, 2006.

YOUDIM, M. B.; WEINSTOCK, M. Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation. **Neurotoxicology.**, v. 25, n. 1-2, p. 243-50, 2004.

ANEXO A- APROVAÇÕES DO COMITÊ DE ÉTICA



COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA



Cruz Alta, 10 de Dezembro de 2009.

À Pesquisadora:

Prof Vitória Berg Cattani

Curso de Farmácia / Nesta Instituição

Ref. ao Projeto de Pesquisa: Avaliação dos possíveis efeitos antioxidantes e antidepressivos da *Ilex paraguariensis* St Hill (Erva-Mate)

O COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA, após analisar as pendências do projeto e a documentação do mesmo, o considerou **APROVADO**. O seu número de **REGISTRO** no CEP é: **A011-09**. Salientamos que, no prazo de um ano, deve ser encaminhado ao CEP o relatório e/ou a publicação dos resultados do referido projeto. Este prazo vence em Dezembro de 2010.


.....
Marília de Rosso Krug
Coordenadora do CEP



Campus Universitário - UNICRUZ Fone (55) 3321- 1606

Email- secretaria.cepunicruz@gmail.com



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Avaliação dos possíveis mecanismos relacionados à atividade antidepressiva da *Ilex paraguariensis*."

Número do Parecer: 073/2014

Pesquisador Responsável: Prof^a. Dr^a. Roselei Fachinetto

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DE APROVAÇÃO: 07/08/2014.

Santa Maria, 07 de Agosto de 2014.

Prof. Dr^a. Vania Lucia Loro

Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM