

**EFEITO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) SOBRE O METABOLISMO
DO SISTEMA NERVOSO DE RATOS DIABÉTICOS**

LUCAS CASAGRANDE

Porto Alegre
Novembro de 2015

Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o metabolismo do sistema nervoso de ratos diabéticos

Lucas Casagrande

Trabalho de conclusão de curso de graduação submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Denise Maria Zancan

Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre

Novembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer profundamente ao Professor Luiz Carlos Kucharski pela paciência, suporte, consideração, incentivo, orientação e sabedoria que me auxiliou muito na finalização deste Trabalho de Conclusão de Curso. Obrigado pela disposição e fácil acessibilidade.

Agradeço a todos os professores e alunos integrantes do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) pela ajuda, conversas, descontração e conselhos. Consideração especial para a Débora Santos Rocha pela atenção e grande auxílio durante a realização de todo o trabalho.

Agradeço a todos os amigos que a UFRGS me proporcionou durante esses cinco anos de graduação (Amanda, Bruna, Débora, Jeniffer, Jennifer, Lilith, Malu, Natália, Pâmela, Paty, Pietro, Samuel, Verônica). Obrigado pelo carinho, pela descontração e pelo apoio ao longo desta grande jornada. Sei que sempre poderei contar com vocês e espero que nosso grupo permaneça unido para sempre.

Agradeço à minha família por todo o cuidado e dedicação. Obrigado pela presença de vocês, proporcionando segurança e certeza de que não estou sozinho. Agradeço por todo carinho, apoio e esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Obrigado.

Agradeço a UFRGS, ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde e ao Departamento de Fisiologia por disporem de todo o material e auxílio logístico quando preciso. Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica durante o período de realização deste projeto.

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) tem sido amplamente divulgada por seus benefícios para a saúde, uma vez que diversos fitoquímicos estão presentes em sua composição. Entre eles, podemos encontrar metilxantinas, saponinas e polifenóis, que atuam como antioxidante, cardioprotetor, hipocolesterolêmico, anti-inflamatório e também podem contribuir na perda de peso. Neste estudo, foi avaliado o metabolismo do sistema nervoso em ratos normais e diabéticos tratados com extrato aquoso de erva-mate. Foram utilizados 36 ratos Wistar machos com dois meses de idade advindos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante o experimento, todos os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, nas condições habituais do biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo controle (CTR) e grupo diabético (DBT): animais normais e diabéticos, respectivamente, ambos tratados com água *ad libitum*; grupo controle-mate (CTR-mate) e grupo diabético-mate (DBT-mate): animais normais ou diabéticos tratados com extrato aquoso de erva-mate *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As infusões foram preparadas com 70g de erva-mate em 1 litro de água. Após o resfriamento estes extratos eram colocados nos bebedouros e oferecidos imediatamente aos animais. Depois de um tratamento de um mês, os animais foram mortos por decapitação. O córtex cerebral e o bulbo olfatório foram retirados e congelados e o sangue foi coletado para posteriores análises. Para teste de normalidade utilizou-se Shapiro-Wilk. Para a comparação dos extratos foi utilizado o teste t de Student e para a comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$. Nos parâmetros sorológicos, foi possível observar que a glicemia, os triglicerídeos e o colesterol total apresentaram uma diferença significativa nos grupos DBT e DBT-mate em relação aos grupos CTR e CTR-mate. Também houve variação em relação ao tratamento e interação entre os fatores tratamento e modelo diabetes no parâmetro glicemia, em que houve uma diminuição da concentração sanguínea de glicose nos animais do grupo DBT-mate em comparação ao grupo DBT. Os tecidos foram pesados, para obtenção de um índice com a relação peso do tecido/peso corporal do animal. Foram observadas diferenças significativas no modelo de diabetes e no

tratamento, havendo uma redução no índice morfométrico do bulbo olfatório do grupo DBT em relação aos controles e um aumento do índice no bulbo dos animais pertencentes ao grupo DBT-mate em relação ao grupo DBT. Foi avaliada a oxidação de ^{14}C -glicose em ambos os tecidos, havendo um aumento na oxidação da glicose no córtex e no bulbo dos animais DBT em relação aos controles e uma diminuição da oxidação somente no bulbo dos ratos DBT-mate em relação ao grupo DBT. Finalmente, avaliou-se a conversão de glicose em glicogênio, que estava reduzida no grupo DBT-mate em relação ao grupo CTR-mate. Este estudo mostrou que a erva-mate possui efeitos positivos sobre o metabolismo do sistema nervoso de ratos diabéticos e sobre a glicemia.

Palavras chave: Erva-mate; córtex cerebral; bulbo olfatório; diabetes.

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) has been widely publicized for its health benefits, since many phytochemicals are present in its composition. Among them we can find methylxanthines, saponins and polyphenols, which act as antioxidant, cardio protective, hypocholesterolemic, anti-inflammatory and can also help in weight loss. In this study, we evaluated the metabolism of the nervous system in normal and diabetic rats treated with aqueous extract of yerba mate. A total of 36 male Wistar rats were used. All animals were kept during the experimentation period in the Animal Experimentation Unit (UEA) of Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA) on normal conditions with light / dark cycle of 12 hours and 22 ± 2 ° C temperature. The animals were divided into four groups: control group (CTR) and diabetic group (DBT): normal or diabetic animals, treated with water ad libitum; control group-mate (CTR-mate) and diabetic-mate group (DBT-mate): normal or diabetic animals treated with aqueous extract of yerba mate ad libitum. This study was approved by the Ethics Committee of the Porto Alegre University Hospital. The infusions were prepared with 70g of yerba mate in 1 liter of water. After cooling, these extracts were immediately offered to animals. After a one month treatment, the animals were killed by decapitation. The cerebral cortex and olfactory bulb were excised and frozen and the blood was collected for further analysis. For normality test, we used the ShapiroWilk test. For comparison between groups we used two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey`s range test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. A series of serological parameters were studied. We observed that blood glucose, triglycerides and total cholesterol showed a significant difference in DBT groups and DBT-mate compared to the CTR and CTR-mate groups. Also, we found a decrease in blood glucose concentration in the animals of DBT-mate group compared to the DBT group. The ratio of the weight of the tissue/body weight showed significant differences, with a reduction in morphometric index of the olfactory bulb in DBT compared to both control groups. We also found an increase in the ratio of the weight of the tissue/body weight on the bulb of the DBT-mate group compared to the DBT group. The oxidation of ^{14}C -glucose was assessed in both tissues, with an increase in the oxidation of glucose in the cortex and the bulb of the DBT animals compared to the controls group and a decrease in oxidation in the bulb of the DBT-mate rats compared to the DBT group. Finally, the conversion of glucose into glycogen was evaluated, which was reduced in DBT mate group compared to the CTR group mate. This study showed that

the yerba mate affects positively the metabolism of the nervous system of diabetic rats and in the blood glucose.

Keywords: Yerba mate; cerebral cortex; olfactory bulb; diabetes.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1 - Efeito do tratamento com Chá de Erva-Mate sob os índices morfométricos do córtex (A) e do bulbo olfatório (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes.

Figura 2 - Efeito do tratamento com Chá de Erva-Mate sob a oxidação da glicose no córtex (A) e no bulbo olfatório (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes.

Figura 3 - Efeito do tratamento com Chá de Erva-Mate sobre a incorporação de glicose em glicogênio no córtex (A) e no bulbo olfatório (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes.

TABELAS

Tabela 1 - Efeito do tratamento com chá de erva-mate sob parâmetros sorológicos em ratos submetidos ao modelo de diabetes e controles.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	8
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Aspectos botânicos e distribuição geográfica	10
1.2 Uso e importância da erva-mate.....	11
1.3 Diabetes melito	12
2 OBJETIVO GERAL	14
2.1 Objetivos específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Animais.....	15
3.2 Indução do diabetes	15
3.3 Preparação do extrato aquoso de erva-mate.....	15
3.4 Tratamento e procedimentos experimentais	16
3.5 Parâmetros morfométricos	17
3.6 Procedimentos experimentais <i>in vitro</i>	17
3.5.1 Determinação da oxidação de glicose	17
3.5.2 Incorporação de D-U- ¹⁴ C-glicose em glicogênio	18
3.7 Análises bioquímicas	18
3.8 Análise estatística	18
4 RESULTADOS.....	20
4.1 Parametros Sorológicos	20
4.2 Parametros Morfométricos	22
4.3 Oxidação de ¹⁴ C-Glicose	24

4.4	Incorporação de D-U- ¹⁴ C-glicose em glicogênio	26
5	DISCUSSÃO	28
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos botânicos e distribuição geográfica

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) é uma espécie arbórea nativa da América do Sul representante da família Aquifoliaceae. O genero *Ilex* possui mais de 550 espécies, das quais aproximadamente 60 ocorrem no Brasil. Porém, apenas cinco destas espécies podem ser utilizadas para o consumo (Anuário Brasileiro da Erva-Mate, 1999).

Na floresta, estas plantas podem atingir até 25m e 70cm de DAP (diâmetro a altura do peito), porém quando cultivadas não passam de 5m. A erva-mate é uma planta dióica, embora se encontrem estames e pistilos em todas as flores. Os estames são atrofiados nas flores femininas, enquanto nas masculinas o pistilo se deprime e aborta, tendo como única forma de reprodução a fecundação cruzada (Ferreira Filho, 1957). O caule possui cor acinzentada, geralmente com 20 a 25 centímetros de diâmetro, podendo alcançar 50 centímetros (Mazuchowski, 1989). As folhas são de coloração verde escura, de 6 a 20 centímetros de comprimento, simples, oblongas, alternas, curto-pecioladas, com margens crenadas ou serradas. A floração ocorre de setembro a dezembro e os frutos podem estar maduros de dezembro a abril. Os frutos são avermelhados, globosos, de polpa carnosa com 5 a 8 sementes (Lorenzi, 2008).

A erva-mate é amplamente difundida na Região Sul do Brasil, no noroeste da Argentina e na parte oriental do Paraguai (Oliveira e Rotta, 1985). A *Ilex paraguariensis* está distribuída em uma área de aproximadamente 540.000 km² (latitude de 21° até 30°S e longitudes de 48°30' até 56°10'W) em altitudes que variam entre 500 a 1500 metros sobre o nível do mar (Mazuchowski, 1989). No Brasil, ocupa uma área total de 450.000 km², abrangendo quase todo o estado de Santa Catarina, centro-norte do Rio Grande do Sul, sul do Mato Grosso do Sul e manchas em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Valduga, 2003).

As condições de desenvolvimento podem afetar a longevidade, sanidade e produtividade da erva-mate. O solo deve ser profundo, bem drenado, ligeiramente ácido, argilosos ou silico-argilosos. Apesar de ocorrer naturalmente em sub-bosques, pode resistir ao céu aberto, suportando temperaturas de até -22°C (Heck e De Mejia, 2007).

1.2 Uso e importância da erva-mate

As folhas e ramos da erva-mate são utilizados no preparo de quatro diferentes tipos de bebidas: o chimarrão ou mate, consumidos no sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai; o tererê, consumido principalmente no Paraguai e no centro-oeste do Brasil; o mate solúvel, muito popular no sudeste do Brasil, principalmente em São Paulo e Rio de Janeiro; e o chá mate, consumido no sul e sudeste do Brasil e Argentina (Bastos *et al.*, 2007, Morais *et al.*, 2009, Bracesco *et al.*, 2011).

O tradicional chimarrão consumido no sul do Brasil é preparado com uma grande quantidade de erva-mate previamente umedecida e compactada em um dos lados da cuia (recipiente feito com porongo), servido com água quente e bebido através da bomba (canudo que atua como um filtro para as pequenas partículas de erva-mate). O tererê, bebida original do Paraguai, é preparado com erva-mate (na mesma disposição do chimarrão), porém, ao invés de uma cuia, o tererê é servido em uma guampa (chifre bovino) com água gelada ou em outras variações com suco de limão, laranja ou leite. Tanto o mate solúvel como o chá mate são obtidos a partir da “torra” da erva-mate, porém, o mate solúvel é consumido na forma de bebidas refrescantes, como um chá gelado, podendo ser também flavorizado e o chá mate é preparado como qualquer outro chá de ervas em sachês e normalmente é consumido quente. A erva mate na atualidade é um dos principais produtos agrícolas da região sul, com grande potencial econômico, social e ecológico. O mate é consumido em proporções que chegam a um litro por dia por milhões de pessoas e constitui a principal alternativa ao café e chá (Mosimann *et al.*, 2008).

Além do uso para a preparação das bebidas anteriormente citadas, na última década, houve um aumento expressivo do uso da erva-mate como ingrediente de outros produtos não tradicionais, tais como cervejas, balas, cremes, cosméticos (Bastos *et al.*, 2007, Bracesco *et al.*, 2011).

A erva-mate está sendo altamente divulgada por seus benefícios para a saúde, uma vez que diversos fitoquímicos estão presentes no mate. Entre eles, podemos encontrar metilxantinas e polifenóis. As xantinas que são encontradas na *I. paraguariensis* são teobromina e cafeína, onde a cafeína é encontrada em maior concentração (Heck e De Mejia, 2007). Outros elementos importantes que fazem parte da composição da erva-mate são as saponinas.

Verificou-se que o mate atua como antioxidante, uma vez que este possui uma alta concentração de polifenóis com efeitos biológicos potencialmente benéficos para a saúde humana (Bravo et al., 2007). O *Ilex paraguariensis* também possui efeito hipocolesterolêmico (Filip e Ferraro 2003), pode atuar como estimulante do sistema nervoso central e diurético (Gonzalez et al., 1993). O mate também pode contribuir com a perda de peso e está sendo utilizado como suplemento dietético. Homens e mulheres obesas que consomem chá mate apresentam uma diminuição no quociente respiratório, indicando um aumento da oxidação de gordura (Martinet et al., 1999).

Um estudo realizado por Kang e colaboradores (2012) mostrou que o *Ilex paraguariensis* é capaz de interferir no metabolismo de lipídios em ratos obesos e diabéticos. A erva-mate é capaz de reduzir o acúmulo de lipídios nos adipócitos, diminuindo o peso corporal dos animais. Também houve uma diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol, triglicerídios, e concentração de glicose nos ratos tratados. Até o momento, não foram realizados estudos que relacionassem o consumo de extrato aquoso de erva-mate sobre os possíveis mecanismos de ação do mate no metabolismo do sistema nervoso.

1.3 Diabetes melito

Segundo a *American Diabetes Association* (2004), o diabetes melito é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos. O diabetes está rapidamente se tornando uma epidemia global e um desafio ao sistema público de saúde.

A Associação Brasileira de diabetes (2000) classifica o diabetes em dois tipos. O diabetes do tipo 1 está associada a destruição das células beta, ocasionando deficiência absoluta de insulina, de natureza auto-imune ou idiopática. O diabetes do tipo 2 varia de uma predominância de resistência insulínica com relativa deficiência de insulina a um defeito predominantemente secretório, com ou sem resistência insulínica. Dados evidenciam que 90% dos diabéticos apresentam o tipo 2 e apenas 10% o tipo 1 (Funasa, 2002).

O diabetes melito associa-se a um quadro clínico caracterizado por poliúria, polidipsia, polifagia, cetoacidose, perda de peso e astenia (*American Diabetes Association*, 2004). Também, é possível observar que o metabolismo de glicose, lipídios e proteínas pode ser prejudicado

(Guyton e Hall, 1997; Cotran e Crawford, 2000). Vale ressaltar ainda outra complicação que surge nos casos em que os indivíduos diabéticos fazem uso da insulina. Essa utilização pode desencadear um processo de hipoglicemia devido a um excesso da quantidade do hormônio utilizado, a uma alimentação em quantidade insuficiente ou, até mesmo à falta de alguma refeição, quando for suprimida pelo indivíduo diabético (Anderson, 2000).

O melito também pode estar associado a disfunções e falência de vários órgãos, como olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Complicações em longo prazo do diabetes incluem retinopatia com perda potencial da visão; nefropatia levando à falência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés; vasculopatia periférica, devido a deposição de lipídios nos vasos à medida que vão sendo transportados para os tecidos; e neuropatia autonômica causando sintomas gastrointestinais, genitourinários, cardiovasculares e disfunção sexual (*American Diabetes Association*, 2000).

O diabetes também pode estar relacionado ao déficit cognitivo, demência e ocorrência de derrames. Estudos relataram que, geralmente, pacientes diabéticos possuem um menor desempenho cognitivo em relação aos indivíduos controle (Brands et al., 2007; Knopman et al., 2001).

Entre as principais propriedades biológicas da erva-mate, destacam-se a atividade antioxidante, hipocolesterolêmica, diurética, entre outros efeitos benéficos. Diante disso e sabendo das alterações presentes na fisiopatologia diabetes, como dislipidemia, distúrbios relacionados ao estresse oxidativo, hiperglicemia e consequente disfunção metabólica, torna-se evidente a importância de avaliar o efeito da erva-mate sobre o metabolismo de indivíduos diabéticos.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o metabolismo do córtex cerebral e do bulbo olfatório de ratos normais e diabéticos tratados com extrato aquoso de erva-mate.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de glicose, triglicerídeos, uréia, colesterol e proteínas totais no soro de animais tratados com erva mate.
- Determinar os parâmetros morfológicos do córtex cerebral e do bulbo olfatório após tratamento com erva mate, criando-se um índice a partir do peso do tecido e o peso do animal
- Determinar a oxidação da glicose no córtex cerebral e no bulbo olfatório após tratamento com erva mate.
- Avaliar a incorporação de D-U-¹⁴C-glicose em glicogênio no córtex cerebral e no bulbo olfatório após tratamento com erva mate.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 36 ratos machos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar com 2 meses de idade, advindos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todos os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, nas condições habituais do biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C, alimentados com ração *ad libitum*. Os ratos foram alocados em caixas plásticas conforme os grupos, em número mínimo de três e número máximo de quatro animais por caixa. A identificação foi feita através de pequenas marcas feitas com caneta/pincel atômico 1100-P (marca PILOT®) na base do rabo de cada animal.

Os procedimentos executados obedeceram ao Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório desenvolvido pelo Instituto de Recursos de Animais de Laboratório (NIH, 2010) e está de acordo com a lei N.º11.794/2008 da Constituição Federal que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) sob o número 09-055.

Indução do diabetes

O diabetes foi induzido por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de Streptozotocina (STZ – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) 65 mg/kg. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram concentração de glicose plasmática superior a 250 mg/dL (Packer *et al.*, 2000).

3.2 Preparação do extrato aquoso de erva-mate

Após uma semana de o diabetes estar estabelecido, iniciou-se o tratamento com erva mate. Para a preparação do chá, foi utilizada a marca comercial “Barão” padronizada de um mesmo lote. Primeiramente, aquecia-se um litro de água da torneira com um aquecedor elétrico

em um Becker até 80°C, simulando a temperatura do chimarrão. Em seguida, eram adicionadas 140g ou 70g de erva-mate. Essa solução era misturada com um bastão de vidro e esperava-se 20 minutos para a infusão da erva. Finalmente, filtrava-se com o auxílio de um coador de pano e deixava-se esfriar. Após o resfriamento, estes extratos eram colocados nos bebedouros e oferecidos imediatamente aos animais. A preparação desses extratos era realizada diariamente sempre ao final da tarde (entre 17h e 18h) devido ao hábito noturno desses animais, para que o extrato fosse fornecido no momento do despertar e consumido logo após ser preparado, minimizando assim as perdas de compostos fenólicos voláteis e outros componentes do mate. Para os ratos diabéticos, foi feita uma diluição de 3 vezes à partir do extrato preparado para os animais controle em função do consumo hídrico maior dos animais diabéticos (Henrichs; Malavolta, 2001; Jahn, 2004).

3.3 Tratamento e procedimentos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos: controle (CTR) (n = 9): grupo de animais tratados com ração padrão e água *ad libitum*; controle mate (CTR-MATE) (n = 9): grupo de animais tratados com ração padrão e extrato aquoso de erva-mate *ad libitum* (como única forma de hidratação); diabético (DBT) (n = 9): grupo de animais diabéticos tratados com ração padrão e água *ad libitum*; diabético mate (DBT-MATE) (n = 9): grupo de animais diabéticos tratados com ração padrão e extrato aquoso de erva-mate *ad libitum* (como única forma de hidratação). Todos os animais foram pesados no início e no final do período experimental utilizando-se uma balança semianalítica para pesagem de animais. Assim, utilizou-se o peso dos animais após o tratamento para calcular os índices teciduais.

Após um mês de tratamento, os animais foram mortos por decapitação. Em seguida, o córtex e o bulbo olfatório foram coletados e incubados ou congelados em condições apropriadas para posteriores dosagens bioquímicas e metabólicas. O sangue troncular foi coletado e depositado em tubos de 8 mL com gel ativador de coágulo (Vacuette®). Após foi realizada a separação do soro através da centrifugação (Centrífuga Digital MTDIII Plus) em 1510xg por 10 minutos. O soro foi separado e congelado em eppendorfs de 1,5mL a - 20°C para análises posteriores.

3.4 Parâmetros morfométricos

Após a decapitação foram retirados o neocórtex cerebral e o bulbo olfatório. Esses tecidos foram pesados com o auxílio de uma balança analítica para a determinação da relação entre o peso do tecido e o peso do animal.

3.5 Procedimentos experimentais *in vitro*

3.5.1 Determinação da oxidação de glicose

Amostras de tecidos do córtex cerebral e do bulbo olfatório foram fatiados e colocadas em tubos de vidro, previamente pesados, contendo solução fisiológica Krebs Ringer Bicarbonato, acrescida de 10mM de HEPES, pH 7,8. Em seguida os tecidos foram secos em papel filtro e colocados em vidros com tampa de borracha contendo 0,10 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose (glicose uniformemente marcada) (55 mCi/mmol – Amersham International) e 5 mM glicose. Foi acoplado um vidro em formato de “J” nas tampas de borracha contendo um poço com uma tira de papel Whatman 3MM dobrada, utilizada para a captação do $^{14}\text{CO}_2$ resultante da oxidação da glicose uniformemente marcada. Os tubos foram aerados com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5% v/v) por 30 segundos, tampados e vedados com parafilme. A incubação foi realizada em banho metabólico tipo Dubnoff durante 60 minutos a 37°C com agitação constante.

Após a incubação, a reação de oxidação foi interrompida injetando-se 0,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50% no meio de incubação e 0,25mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2N no poço contendo a tira de papel 3MM. Ambas as aplicações foram realizadas através das tampas de borracha utilizando-se uma seringa com agulha 25x7.

Os tubos permaneceram lacrados e imóveis por 12 horas, em temperatura ambiente, para promover a fixação total do $^{14}\text{CO}_2$ nas tiras de papel. Após este período as tiras de papel 3MM foram transferidas para flaconetes, devidamente identificados, contendo 2,5mL de líquido de cintilação. Finalmente, a reação de oxidação foi medida em um contador LKB-Wallac para determinar a formação do $^{14}\text{CO}_2$. Os resultados foram expressos em nmoles de $^{14}\text{CO}_2$ por grama de tecido por hora de incubação. (Torres *et al.*, 2001).

3.5.2 Incorporação de D-U-¹⁴C-glicose em glicogênio

Amostras de tecidos do córtex cerebral e do bulbo olfatório foram fatiadas e colocadas em tubos de vidro, previamente pesados, contendo solução fisiológica Krebs Ringer Bicarbonato. Em seguida, foram secos em papel filtro e colocados em vidros com tampa de borracha contendo 1 mL de meio de incubação contendo 0,10 μ Ci de D-U-¹⁴C-glicose e 5 mM de glicose não marcada (Wredenber et al. 2006).

Os tecidos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5% v/v) e em seguida os tubos foram fechados. A incubação foi de 60 minutos, a 37°C, com agitação constante. A reação foi interrompida colocando-se os tubos em gelo. Em seguida, os tecidos foram lavados e a extração do glicogênio foi realizada. Para isso, os tecidos foram colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de KOH 30%. Após, os tubos foram levados ao banho-maria para completa digestão do tecido. Após o banho, foi adicionado etanol na concentração de 70% para favorecer a precipitação do glicogênio. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante em seguida. Finalmente, o pellet foi dissolvido com água, adicionando-se líquido de cintilação. A leitura foi realizada em um contador LKB-Wallac com 95% de eficiência.

3.6 Análises bioquímicas

As concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total, triglicerídeos, proteínas totais e ureia foram determinadas pelo uso de kits enzimáticos colorimétricos comerciais (Labtest Diagnóstica SA®). A leitura das amostras foi realizada em microplacas (96 poços) em uma leitora de Elisa espectrofotométrica (BiochromAnthos® Zenyth 200rt) contra o branco do reagente.

3.7 Análise estatística

Para determinar se os dados possuíam distribuição normal foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre os grupos experimentais foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Tukey. Os dados foram expressos

como média \pm desvio padrão da média. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $P \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism[®] 6.0.

4 RESULTADOS

4.1 Parametros Sorológicos

Na tabela 1, podemos observar que os parâmetros de glicemia, triglicerídeos e colesterol apresentaram diferença dos grupos DBT e DBT-mate em relação aos grupos CTR e CTR-mate. Também houve variação em relação ao tratamento e interação entre os fatores tratamento e modelo no parâmetro glicemia, onde houve uma diminuição da concentração sanguínea de glicose nos animais do grupo DBT-mate em comparação ao grupo DBT. Os níveis de colesterol total apresentaram um aumento significativo nos animais dos grupos diabéticos em relação aos controles. Quanto aos níveis de ureia, houve um aumento no grupo DBT em comparação ao grupo CTR. A concentração de proteínas totais mostrou variação referente ao modelo de diabetes, onde o grupo DBT-mate apresentou valores menores frente ao grupo CTR-mate.

Tabela 1. Efeito do tratamento com chá de Erva-Mate sobre parâmetros sorológicos em ratos submetidos ao modelo de diabetes e controle.

Parâmetro	Grupo Experimental				ANOVA
	CTR	CTR-Mate	DBT	DBT-Mate	
Glicemia (mg/dL)	119,3 ± 8,585	124,9 ± 14,55	626,4 ± 78,73 ^{a,b}	548,2 ± 40,84 ^{a,b,c}	#(P<0,0001) *(P=0,0219) &(P=0,0090)
Triglicerídeos (mg/dL)	110,0 ± 38,14	80,16 ± 22,26	358,0 ± 101,1 ^{a,b}	353,7 ± 222,2 ^{a,b}	#(P<0,0001)
Colesterol (mg/dL)	128,0 ± 23,26	133,8 ± 24,39	218,8 ± 58,98 ^{a,b}	214,3 ± 40,33 ^{a,b}	#(P<0,0001)
Uréia (mg/dL)	70,61 ± 16,09	83,51 ± 15,15	100,7 ± 17,81 ^a	89,21 ± 13,00	#(P<0,0001) & (P=0,0257)
Proteínas Totais (g/dL)	6,153 ± 0,841	6,428 ± 0,321	5,670 ± 0,482	5,647 ± 0,556 ^b	#(P=0,0032)

Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey, sendo as fontes de variação representadas por (#) modelo, (*) tratamento, (&) interação modelo e tratamento. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão, sendo (^a) diferença em relação ao grupo CTR, (^b) CTR-Mate e (^c) DBT. São consideradas significativas as diferenças com P ≤ 0,05. n=9 por grupo experimental.

4.2 Parametros Morfométricos

Os tecidos foram pesados, criando-se um índice a partir da razão do peso do tecido e o peso do animal. Não houve diferença estatisticamente significativa no índice do córtex em nenhum dos grupos, como podemos observar na figura 1A (DBT: $0,86 \pm 0,046$; DBT-mate: $0,84 \pm 0,060$; CTR: $0,93 \pm 0,036$; CTR-mate: $0,95 \pm 0,051$ mg/g).

No bulbo (figura 1B), houve uma diminuição significativa no índice dos animais DBT ($0,080 \pm 0,014$ mg/g) em relação ao animais do grupo CTR-mate ($0,14 \pm 0,051$ mg/g). Também podemos observar um aumento no índice dos animais DBT-mate ($0,11 \pm 0,013$ mg/g) em relação aos DBT. Assim, tanto o modelo diabético quanto o tratamento com extrato aquoso de erva-mate mostraram uma variação significativa.

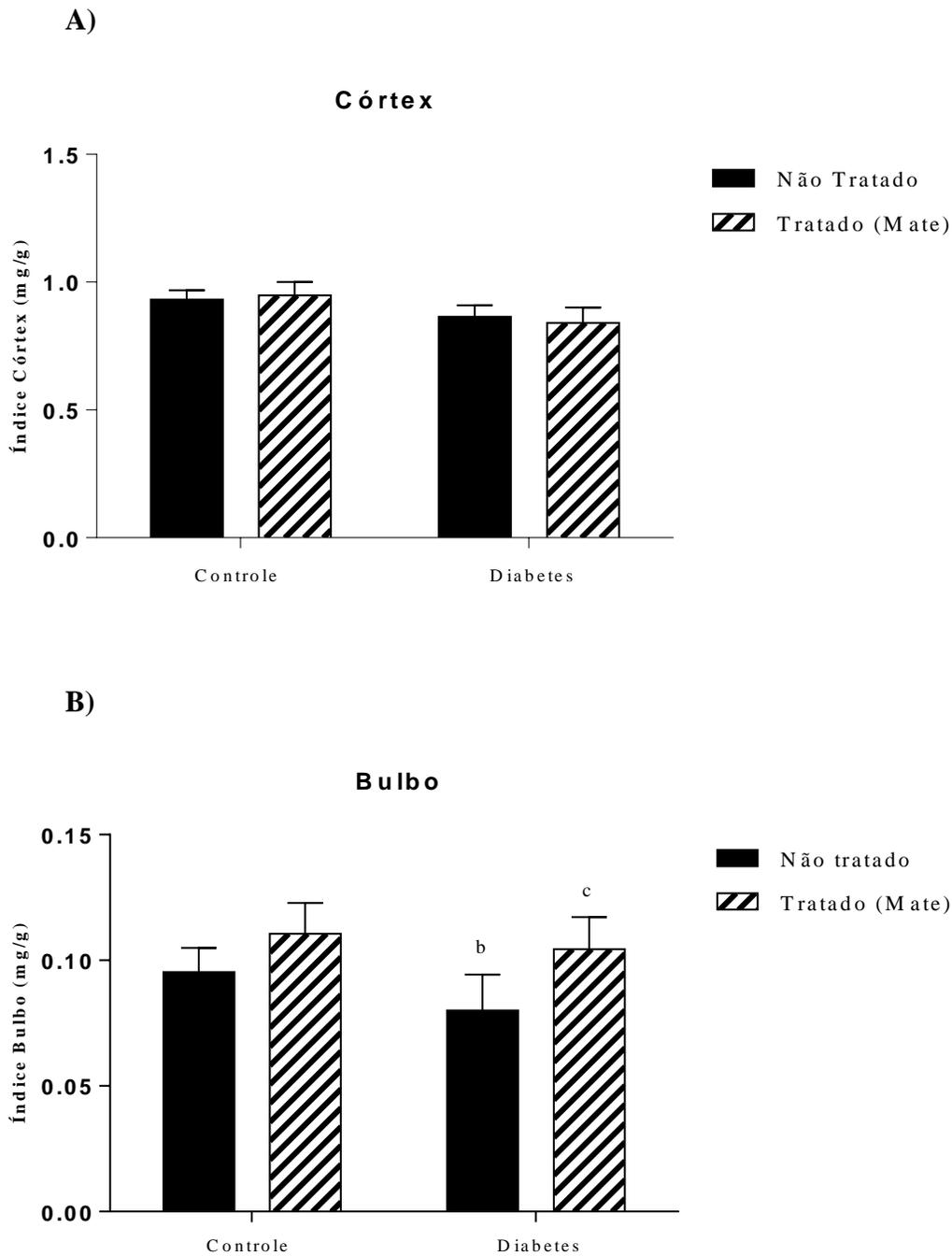


Figura 1. Efeito do tratamento com Chá de Erva-Mate sobre os índices morfométricos do córtex (A) e do bulbo olfatório (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes e controle. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. O modelo de diabetes ($P=0,0141$) e o tratamento ($P<0,0001$) foram observados como fontes de variação no índice morfométrico do bulbo olfatório. (a) diferença estatística em relação ao grupo CTR, (b) CTR-Mate e (c) DBT. São consideradas significativas as diferenças com $P \leq 0,05$. $n=9$ por grupo.

4.3 Oxidação de ^{14}C -Glicose

Determinou-se a ação da erva-mate sobre a oxidação de ^{14}C -glicose no córtex cerebral e no bulbo olfatório. Como podemos observar na figura 2A, houve um aumento na formação de CO_2 no córtex dos animais diabéticos (DBT: $87,48 \pm 11,35$; DBT-mate: $76,55 \pm 19,76 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), tanto em relação ao grupo CTR ($47,25 \pm 5,65 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) quanto em relação aos animais CTR-mate ($43,52 \pm 9,21 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Houve variação significativa no modelo diabetes, porém o tratamento com extrato aquoso de erva-mate não exerceu nenhum efeito estatisticamente significativo na oxidação da glicose.

Na figura 2B, podemos observar que o tratamento com erva-mate reduziu significativamente a oxidação da glicose no bulbo nos animais pertencentes ao grupo CTR-mate ($103,0 \pm 28,07 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em relação ao grupo CTR ($187,9 \pm 17,87 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). O grupo DBT ($518,4 \pm 102,0 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) apresentou níveis de CO_2 mais elevados que os grupos CTR e CTR-mate. Houve também uma diminuição drástica na oxidação da glicose nos animais pertencentes ao grupo DBT-mate ($173,5 \pm 45,52 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em relação ao grupo DBT. O modelo de diabetes, o tratamento e a interação entre modelo e tratamento apresentaram significância estatística na oxidação de glicose no bulbo olfatório.

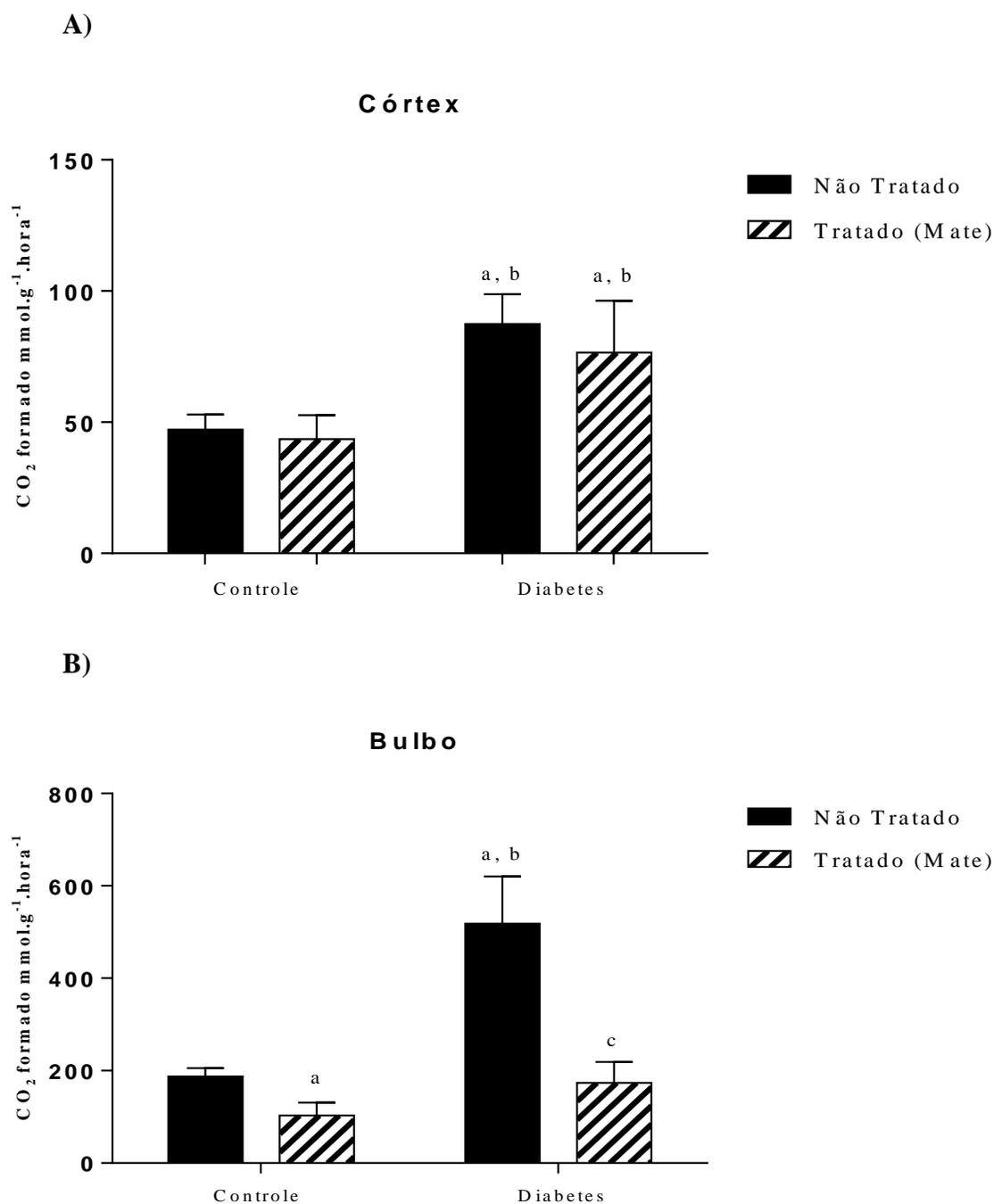


Figura 2. Efeito do tratamento com Chá de Erva-Mate sob a oxidação da glicose no córtex (A) e no bulbo olfatório (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes e controle. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. O modelo de diabetes ($P < 0,0001$) foi observado como fonte de variação na oxidação da glicose no córtex. O modelo de diabetes ($P < 0,0001$), o tratamento ($P < 0,0001$) e a interação entre modelo e tratamento ($P < 0,0001$) foram observados como fontes de variação na oxidação de glicose no bulbo olfatório. (a) diferença estatística em relação ao grupo CTR, (b) CTR-Mate e (c) DBT. São consideradas significativas as diferenças com $P \leq 0,05$. $n=9$ por grupo.

4.4 Incorporação de D-U-¹⁴C-glicose em glicogênio

Verificou-se o efeito do tratamento de extrato aquoso de erva-mate sobre a conversão de glicose em glicogênio no córtex e no bulbo. No córtex (figura 3A), não foi possível observar nenhuma diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos (CTR: $18,07 \pm 4,96$; CTR-mate: $19,74 \pm 3,40$; DBT: $22,85 \pm 5,68$; DBT-mate: $20,06 \pm 3,01$ mmol.g⁻¹.h⁻¹).

No bulbo olfatório (figura 3B), foi possível observar uma menor atividade de conversão de glicose em glicogênio no grupo DBT-mate ($39,64 \pm 9,32$ mmol.g⁻¹.h⁻¹) em relação ao grupo CTR-mate ($67,11 \pm 19,29$ mmol.g⁻¹.h⁻¹), mostrando que o modelo diabetes possui uma redução significativa da incorporação de glicose em glicogênio.

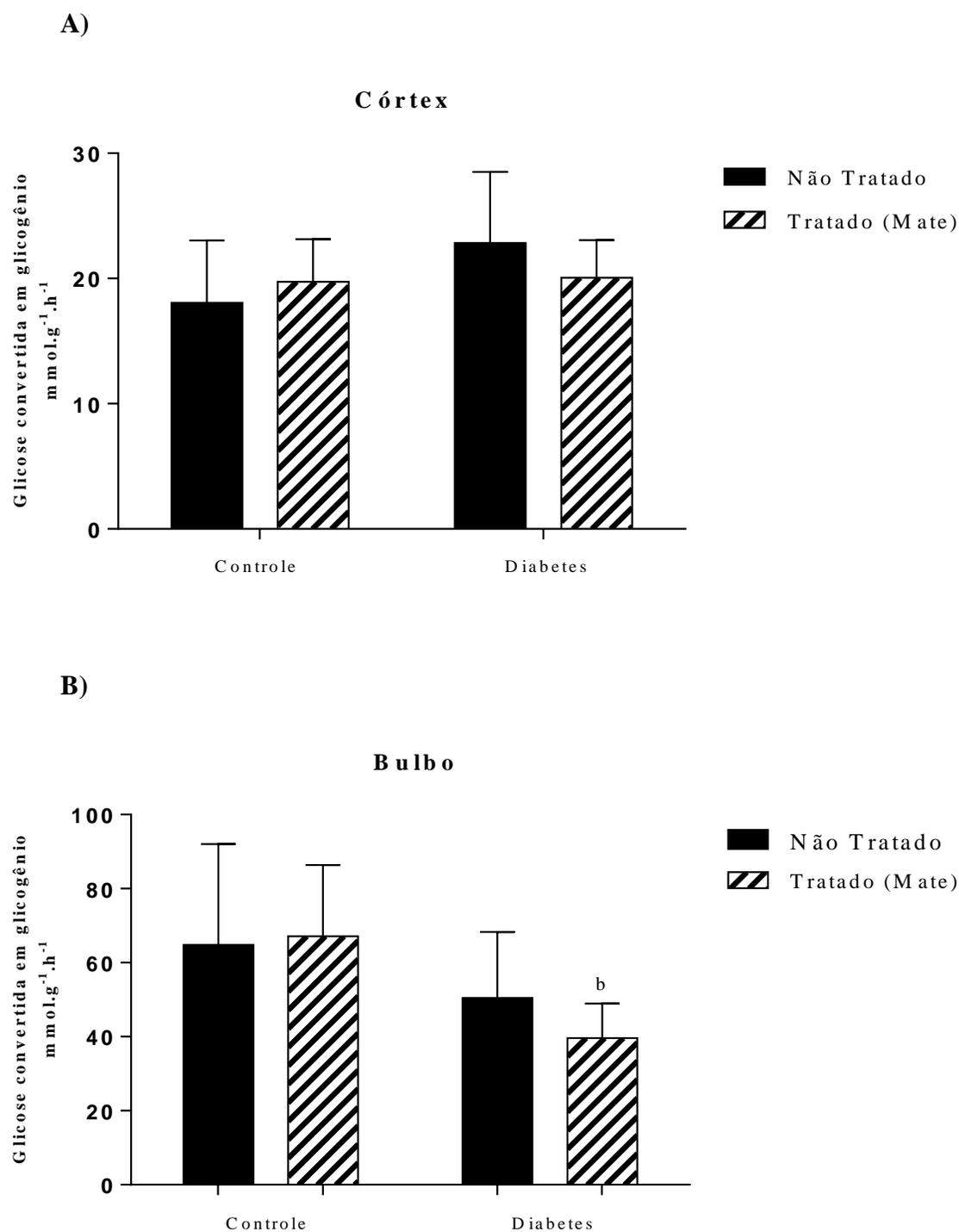


Figura 3. Efeito do tratamento com Chá de Erva-Mate sob a glicogênese no córtex (A) e no bulbo olfatório (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. O modelo de diabetes ($P=0,0031$) foi observado como fonte de variação na conversão de glicose em glicogênio no bulbo olfatório. (a) diferença estatística em relação ao grupo CTR, (b) CTR-Mate e (c) DBT. São consideradas significativas as diferenças com $P \leq 0,05$. $n=9$ por grupo.

5 DISCUSSÃO

O diabetes pode causar uma série de distúrbios neuroquímicos e estruturais, podendo afetar diretamente o metabolismo dos tecidos nervosos. Este estudo avaliou o metabolismo do córtex cerebral e do bulbo olfatório de ratos controles e diabéticos após um mês de tratamento com extrato aquoso de erva-mate. Para isso, comparou-se os índices morfométricos, a oxidação de ^{14}C -Glicose e a incorporação de D-U- ^{14}C -glicose em glicogênio de ambos os tecidos de cada grupo.

As concentrações de glicose, triglicerídeos, colesterol, ureia e proteínas totais foram avaliadas no soro dos diferentes grupos experimentais. Foi possível observar um aumento em todos esses parâmetros nos indivíduos diabéticos. Porém, o tratamento foi efetivo apenas na redução da glicemia. Essa redução corrobora com os resultados obtidos por Klein *et al.* (2011), que comparou o efeito exercido pelo extrato aquoso de erva-mate no perfil glicêmico de pacientes diabéticos. O tratamento teve uma duração total de 60 dias e foi capaz de diminuir a glicemia dos indivíduos estudados.

Resende *et al.* (2012) avaliou os efeitos do extrato aquoso de erva-mate e dos extratos com frações dos frutos e frações de saponinas da erva-mate sobre o metabolismo de ratos com dieta padrão pelo período de 30 dias. Neste estudo foi observado que, em geral, os tratamentos não modificaram os níveis plasmáticos de colesterol total, creatinina, ureia e glicose em relação ao grupo controle, com exceção do grupo que recebeu o extrato dos frutos da erva-mate, o qual apresentou aumento significativo da glicose. Além disso, todos os extratos reduziram significativamente os níveis de triglicerídeos plasmáticos. Os autores deste estudo sugerem que a redução dos triglicerídeos plasmáticos parece estar associada com o conteúdo de saponinas, visto que essa redução foi maior no grupo do extrato dos frutos e no grupo das frações de saponinas.

Para a determinação dos parâmetros morfométricos, utilizou-se o índice a partir da razão do peso do tecido e do peso corporal do animal. No córtex cerebral não foi observado nenhuma mudança significativa. Porém, houve uma redução na relação peso do tecido/peso do animal do bulbo olfatório nos animais diabéticos e um aumento nos ratos tratados com extrato aquoso de erva-mate. Os valores dos índices dos animais diabéticos que foram tratados com o mate chegaram próximo aos valores dos animais controle, mostrando que o tratamento foi efetivo em reverter o efeito produzido pelo diabetes.

O estresse oxidativo é definido como a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e pode afetar o funcionamento do sistema nervoso central pela ativação de receptores de glutamato (Ilhan *et al.*, 2005). Este aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio pode levar à morte neuronal (Sharma *et al.*, 2010), o que aumenta a susceptibilidade do indivíduo para a ocorrência de distúrbios neurodegenerativos, tais como Alzheimer, Parkinson, depressão e Huntington (Turner e Schapira, 2001; Guo *et al.*, 2010; Ott *et al.*, 1999). Já está bem estabelecido que a erva-mate possui uma função neuroprotetora, podendo auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas (Maia e Mendonça, 2002; Dall'igna *et al.*, 2007). Assim, o mate pode também ser utilizada como uma possível abordagem terapêutica para o diabetes.

O sistema nervoso central possui uma pequena capacidade de autorreparação, uma vez que este conta com a presença de células-tronco adultas neurais ou células progenitoras neurais (Bartley *et al.*, 2005). Segundo um estudo realizado por Pagano e colaboradores (2000), as regiões que possuem uma maior concentração de células neurogênicas do cérebro de mamíferos são o hipocampo, a zona subventricular do ventrículo lateral e o bulbo olfatório. Estas células-tronco podem se diferenciar em: neuronios, astrócitos e oligodendrócitos (D'Amour, 2003).

Durante o processo de neurogênese, a insulina apresenta um papel importante no controle de células-tronco do sistema nervoso, promovendo a sua diferenciação em oligodendrócitos (Hsieh, 2004). Além disso, a insulina promove a função do fator de crescimento de fibroblastos-2, que possui um papel importante na manutenção das células-tronco em seu estado indiferenciado (Arsenijevic, 2001).

Na presença de baixos níveis de insulina, as funções proliferativas das células-tronco indiferenciadas são suprimidas. O diabetes prejudica a função das células-tronco do músculo esquelético, dos osteoblastos e do sistema nervoso (Jang, 2011; Bachor e Suburo, 2012). A redução da neurogênese causada pelo diabetes foi detectada principalmente no hipocampo, estando associada a um declínio nas funções cognitivas de aprendizagem e memória (Stranaham, 2008). Um estudo realizado por Hidaka e colaboradores (2013) avaliou a neurodegeneração causada pelo diabetes no cérebro de ratos adultos, mostrando que o efeito no bulbo olfatório é semelhante ao hipocampo.

Vários estudos mostram que as metilxantinas presentes na erva-mate, principalmente a cafeína, produzem uma melhora do processo cognitivo tanto em diferentes modelos animais quanto em humanos, bem como efeito neuroprotetor (Riedel *et al.*, 1995; Angelucci *et al.*, 1999;

Prediger *et al.*, 2005; Kumral *et al.*, 2010). Estes estudos tem sugerido o uso da cafeína como uma possível abordagem terapêutica para doenças neurodegenerativas como, por exemplo, a doença de Alzheimer (Maia e Mendonça, 2002).

Dados encontrados na literatura apontam que o antagonismo dos receptores de adenosina é um mecanismo importante para o efeito benéfico no processo cognitivo. Prediger e colaboradores (2008) mostraram que o tratamento agudo com extrato de *Ilex paraguariensis* pode melhorar a função cognitiva em ratos. Os resultados obtidos por este estudo destaca o provável antagonismo de receptores de adenosina como responsável pelo efeito benéfico da função cognitiva. O mecanismo envolvido em relação ao efeito benéfico sobre a memória das metilxantinas poderia ser devido a um antagonismo competitivo com os receptores de adenosina (Nehlig *et al.* 1992). O bloqueio dos receptores de adenosina causado pelo diabetes pode afetar o metabolismo de glicose, uma vez que este inibe a liberação de uma série de neurotransmissores, como o glutamato. Este neurotransmissor é responsável pela utilização de 80 a 90% da glicose captada pelo sistema nervoso (Magistretti *et al.*, 1999).

Qian e colaboradores (2002) avaliou o efeito de diferentes doses de saponinas provenientes da planta *Dipsacus asperoides* em células do sistema nervoso danificadas pela proteína β -amiloide, que aumenta os níveis de radicais livres, causando dano nas células nervosas a partir da alteração da homeostase do cálcio intracelular. Seus resultados mostraram que as saponinas, mesmo em pequenas doses, são capazes de aumentar a sobrevivência das células, atuando como neuroprotetores. Rastogi *et al.* (2011) avaliou o efeito das saponinas presentes na planta medicinal *Bacopa monnieri* na neurodegeneração causada pelo envelhecimento em ratos. Seus resultados mostraram que as saponinas podem prevenir doenças neuropatológicas, incluindo o Alzheimer.

Como podemos observar, existe um efeito importante dos compostos da erva-mate sobre o sistema nervoso, assim como a alteração pelo diabetes. Assim também foi avaliado o efeito do tratamento como extrato de erva-mate na oxidação de glicose no córtex cerebral e bulbo olfatório. No córtex cerebral, foi possível observar um aumento na oxidação de glicose dos animais diabéticos, não havendo diferença significativa no tratamento. No bulbo também ocorreu um aumento na liberação de CO₂ nos ratos diabéticos, porém, este foi reduzido a valores próximos aos animais controle com o tratamento de erva-mate.

Diversos estudos mostram que a oxidação de glicose é menor em indivíduos diabéticos (Meyer *et al.*, 1980; Boden, 1983; Golay *et al.*, 1982). Os níveis de carboidratos elevados causam auto-oxidação de glicose, formando espécies reativas de oxigênio tais como ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio, entre outros (Baynes e Thorpe, 1999).

Resende *et al.* (2012) avaliou a atividade das saponinas presentes na erva-mate na oxidação da glicose no fígado e no tecido adiposo, observando uma redução significativa na atividade em ambos os tecidos. Estes resultados condizem com os encontrados neste estudo, uma vez que foi possível observar uma redução na produção de CO₂ no córtex e, principalmente, no bulbo dos animais tratados com erva-mate.

Finalmente, avaliou-se a conversão de glicose em glicogênio, não havendo nenhuma diferença significativa no córtex cerebral. No bulbo olfatório, foi observada uma diminuição significativa nos animais diabéticos tratados com erva-mate em relação aos animais controle também tratados com erva-mate. O diabetes está associado a uma diminuição do efeito da enzima glicogênio sintase, podendo reduzir a conversão de glicose em glicogênio (Thorburn, 1990).

O bulbo olfatório apresenta uma grande variedade de neurotransmissores e neuromoduladores, havendo uma alta atividade glicogenolítica. Também há uma grande quantidade de potássio no meio extracelular, que associado à despolarização neuronal, estimula a glicogenólise. No bulbo olfatório também há uma grande atividade da enzima glicogênio fosforilase e uma reserva de glicogênio duas vezes maior quando comparado ao córtex cerebral, indicando um rápido turnover de glicogênio (Coopersmith e Leon, 1995), essencial para o suprimento energético de uma estrutura de grande importância para roedores.

Assim podemos concluir que a erva-mate foi capaz de alterar os níveis de glicemia, oxidação e incorporação de glicose em glicogênio no bulbo olfatório e não produzindo alterações significativas no córtex cerebral. Também foi observado que o bulbo olfatório parece apresentar atividade metabólica maior que o córtex, uma vez que os valores encontrados para oxidação e incorporação de glicogênio foram maiores nessa estrutura. Este fato pode ser reforçado quando observamos o índice morfométrico que foi menor no bulbo olfatório quando comparado com o córtex.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando avaliamos a literatura disponível encontramos poucos estudos realizados sobre o efeito da erva-mate no metabolismo do sistema nervoso de animais diabéticos. Este foi um dos primeiros trabalhos a demonstrar que o extrato aquoso de erva-mate é capaz de interferir positivamente no metabolismo do cérebro em animais diabéticos.

Provavelmente a erva-mate pode estar tendo um efeito protetor no processo neurodegeneração causada pelo diabetes, pois alguns dos resultados ficaram próximos ao valor do grupo controle após o animal diabético ter sido tratado com erva mate. Também observamos que o seu potencial efeito antioxidante pode normalizar a oxidação de glicose que esta aumentada pelo diabetes.

Mais estudos são necessários para estabelecer que outras vias metabólicas, fatores ou hormônios podem estar sendo influenciados pelo tratamento com a erva-mate e se esses resultados podem se repetir em outros modelos animais ou em diferentes preparações de extratos de erva mate. Também é necessária a realização de avaliação em outras regiões do sistema nervoso central, como por exemplo, no hipocampo e no hipotálamo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2004. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 27: 5-10.

ANDERSON, J. W. 1999. Nutritional Management of Diabetes Mellitus. **Modern nutrition in health and disease**. 9th. ed. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins. 86: 1365- 1395.

ANGELUCCI, M. E.; VITAL, M. A.; CESARIO, C.; ZADUSKY, C. R.; ROSALEN, P. L.; DA CUNHA, C. 1999. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. **European Journal of Pharmacology**, 373:135- 40.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA MATE. 1999. Santa Cruz do Sul (RS): **Gazeta Grupo de Comunicações**,. 63p.

ARSENIJEVIC, Y.; WEISS, S.; SCHNEIDER B.; AEBISCHER, P. 2001. Insulin-like growth factor-i is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. **The Journal of Neuroscience**, 21(18):7194-202.

BACHOR T. P.; SUBURO A. M. 2012. Neural stem cells in the diabetic brain. **Stem Cells International**, 2012:820790.

BARTLEY J.; SOLTAU T.; WIMBORNE H. 2005. BrdU-positive cells in the neonatal mouse hippocampus following hypoxic-ischemic brain injury. **BMC Neuroscience**, 6:15.

BASTOS, D. H. M.; DE OLIVEIRA, D. M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L. 2007. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, 1(1): 37-46.

BAYNES, J. W.; THORPR S. R. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complication: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, 48: 1-9.

BODEN G.; RAY T. K.; SMITH R. H.; OWEN O. E. 1983. Carbohydrate oxidation and storage in obese non-insulin-dependent diabetic patients. Effects of improving glycemic control. **Diabetes**, 32(11):982–987.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: mini review. **Journal of Ethnopharmacology**, 136: 378-384.

BRANDS A. M.; VAN DEN BERG E.; MANSCHOT S. M. 2007. A detailed profile of cognitive dysfunction and its relation to psychological distress in patients with type 2 diabetes mellitus. **International Neuropsychological Society**, 13:288–297.

BRAVO L.; GOYA L.; LECUMBERRI E. 2007. LC/MS characterization of phenolic constituents of Mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International Journal**, 40:393–405.

- COOPERSMITH, R.; LEON, M. 1995. Olfactory bulb glycogen metabolism: noradrenergic modulation in the young rat. **Brain Research**, 674: 230-237.
- COTRAN, R. S.; PATH, F. R. C.; COLLINS, T. 2000. Robbins: Patologia Estrutural e Funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 817-830.
- DALL'IGNA, O. P.; FETT, P.; GOMES, M. W.; SOUZA, D. O.; CUNHA, R. A.; LARA, D. R. 2007. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent β -amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v.203, p.241–245.
- D'AMOUR, K. A.; GAGE, F. H. 2003. Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, 100:11866–11872.
- FERREIRA FILHO, J. C. 1957. Cultura e preparo da erva-mate. 2 ed. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**, 64p.
- FILIP R.; FERRARO G. E. 2003. Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. **European Journal of Nutrition**, 42:50–4.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Diabetes Mellitus. Cap. 5.5. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Disponível em: <<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa>>. Acesso em: 28 out. 2015.
- FREDHOLM, B. B.; BATTIG, K.; HOLMEN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E. E. 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological reviews**, 51: 83-133.
- GOLAY, A.; SCHUTZ, Y.; MEYER, H. U. 1982. Glucose-induced thermogenesis in nondiabetic and diabetic obese subjects. **Diabetes**, 31:1023–1028.
- GONZALEZ A.; FERREIRA F.; VAZQUEZ A.; MOYNA P.; PAZ E. A. 1993. Biological screening of Uruguayan medicinal-plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 39:217–20.
- GUO, J.; YU, C.; LI, H.; LIU, F.; FENG, R.; WANG, H.; MENG Y.; LI, Z.; JU, G.; WANG, J. 2010. Impaired neural stem/progenitor cell proliferation in streptozotocin-induced and spontaneous diabetic mice. **Neuroscience research**, 68:329–336.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. 1997. Tratado de Fisiologia Médica. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 883-894.
- HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. 2007. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, 72(9): 138-150.
- HIDAKA, R.; MASANAO, M.; FUJIMAKI, S.; TERASHIMA, K.; ASASHIMA, M.; KUWABARA, T. 2013. Monitoring neurodegeneration in diabetes using adult neural stem cells derived from the olfactory bulb. **Stem Cell Research & Therapy**, 4:51.

HSIEH J.; AIMONE J. B.; KASPAR B. K.; KUWABARA T.; NAKASHIMA K.; GAGE F. H. 2004. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. **Journal of Cell Biology**, 164:111–122.

ILHAN, A.; ALADAG, M.A.; KOCER, A.; BOLUK, A.; GUREL, A.; ARMUTCU, F. 2005. Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. **Brain Research Bulletin**, 65:495–499.

JANG, Y. C.; SINHA, M.; CERLETTI, M.; DALL’OSSO, C.; WAGERS, A. J. 2011. Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 76:101–111.

KANG, Y.; LEE, H.; KIM, J.; OH, J.; CHO, S.; KIM, M.; CHAE, S.; KIM, O.; OH, H. 2012. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in C557BL/6J mice fed with a high-fat diet. **Laboratory animal research**, 28(1), 23-29.

KLEIN, G. A.; STEFANUTO, A.; BOAVENTURA, B. C.; MORAIS, E. C.; CAVALCANTE, L.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; PIETRO, P. F.; MARASCHIN, M.; SILVA, E. L. 2011. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. **Journal of the American College of Nutrition**. 30(5):320-328.

KNOPMAN D.; BOLAND L. L.; MOSLEY T. 2001. Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. **Neurology**, 56:42–48.

KUMRAL, A.; YESILIRMAK, D. C.; AYKAN, S.; GENÇ, S.; TUGYAN, K.; CILARES, S.; AKHISAROĞLU, M.; AKSU, I.; SUTCUOĞLU, S.; YILMAZ, O.; DUMAN, N. OZKAN, H. 2010. Protective Effects of Methylxanthines on hypoxia-induced apoptotic neurodegeneration and long-term cognitive functions in the developing rat brain. **Neonatology**, 98: 128–136.

MAIA, L.; MENDONÇA, A. 2002. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? **European Journal of Neurology**, 9: 377–382.

RASTOGI, M.; OJHA, R. P.; PRABU, P. C.; DEVI, B. P.; AGRAWAL, A.; DUBEY, G. P. 2012. Prevention of age-associated neurodegeneration and promotion of healthy brain ageing in female Wistar rats by long term use of bacosides. **Biogerontology**, 13:183–195.

MAGISTRETTI, P.J. & PELLERIN, L. 1999. Astrocyte Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. **News in Physiological Science**, v. 14, p. 177 - 182.

MARTINET A.; HOSTETTMANN K.; SCHUTZ Y. 1999. Thermogenic effects of commercially available plant preparations aimed at treating human obesity. **Phytomedicine** 6:231–238.

MAZUCHOWSKI, J. Z. 1989. Manual de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill). Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. **EMATER**, Paraná, 104p.

MEYER, H. U.; CURCHOD, B.; MAEDER, E. 1980. Modifications of glucose storage and oxidation in nonobese diabetics, measured by continuous indirect calorimetry. **Diabetes**, 29:752–756.

MORAIS, E. C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; BOAVENTURA, B. C. B.; ANDRADE, F.; WASLAWIK, E.; DI PIETRO, P. F.; MARASCHIN, M.; SILVA, E. L. 2009. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dislipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57:8316–8324.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E. L. 2008. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, 26: 59-70.

NEHLIG, A.; DAVAL, J. L.; DEBRY, G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain research reviews**, 17: 1139-1170.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. 1985. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil.). **Seminário Sobre Atualidades E Perspectivas Florestais – Silvicultura Da Erva-Mate**, Curitiba. 17-35.

OTT, A.; STOLK, R. P.; HARSKAMP, F.; POLS, H. A. P.; HOFMAN, A.; BRETELER M. M. B. 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam study. **Neurology**, 53:1937–1942.

PACKER, L.; ROSEN, P.; TRITSCHLER, H.J.; KING, G.L.; AZZI, A. 2000. Antioxidants in diabetes management. New York. Ed. **Marcel Dekker**.

PAGANO, S. F.; IMPAGNATIELLO, F.; GIRELLI, M.; COVA, L.; GRIONI, E.; ONOFRI, M.; CAVALLARO, M.; ETTERI, S.; VITELLO, F.; GIOMBINI, S.; SOLERO, C. L.; PARATI, E. A. 2000. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. **Stem Cells**, 18:295–300.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, M. S.; RIAL, D.; WOPEREIS, S.; PEREIRA, V.S.; BOSSE, T. S.; SILVA, C. B.; CARRADORE, R. S.; MACHADO, M. S.; CECHINEL-FILHO, V.; COSTA-CAMPOS, L. 2008. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of ethnopharmacology**, 120: 465–73.

QIAN, Y. H.; LIU, Y.; HU, H. T.; REN, H. M.; CHEN X. L.; XU J. H. 2002. The effects of the total saponin of *dipsacus asperoides* on the damage of cultured neurons induced by beta-amyloid protein. *Anatomical science international*, 77(3):196-200.

RESENDE, P. E.; VERZA, S. G.; KAISER, S.; GOMES, L. F.; KUCHARSKI, L. C.; ORTEGA, G. G. 2012. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 144: 735–740.

RIEDEL, W.; HOGERVORST, E.; LÉBOUX, R.; VERHEY, F.; PRAAG, H.; JOLLES, J. 1995. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. **Psychopharmacology**, 122(2): 158-68.

SHARMA, V.; NEHRU, B.; MUNSHI, A.; JYOTHY, A. 2010. Antioxidant potential of curcumin against oxidative insult induced by pentylentetrazol in epileptic rats. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, 32: 227–232.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. 2000. Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e Tratamento do Diabetes Mellitus Tipo 2. **Consenso Brasileiro sobre Diabetes**. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/consenso_bras_diabetes.pdf>. Acesso em: 28 out. 2015.

STRANAHAN, A. M.; ARUMUGAM, T. V.; CUTLER, R. G.; LEE, K.; EGAN, J. M.; MATTSON, M. P. 2008. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. **Nature Neuroscience**, 11:309–317.

THORBURN, A. W.; GUMBINER, B.; BULACAN, F.; WALLACE, P.; HENRY, R. R. 1990. Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in non-insulin-dependent (Type II) diabetes independent of impaired glucose uptake. **Journal of Clinical Investigation**, 85:522-529.

TURNER, C.; SCHAPIRA, A.H. 2001. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders and ageing. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 487:229–251.

VALDUGA, A. T.; FINZER, J. R.; MOSELE, S. H. 2003. Processamento de erva-mate. Erechim: **EdiFAPES**, 184 p.