

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DISTÚRBIOS DA  
COMUNICAÇÃO HUMANA**

**Tábada Samantha Marques Rosa**

**O EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA MATE (*ILEX  
PARAGUARIENSIS*) NA INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E  
PREVENÇÃO DE SINTOMAS PARKINSONIANOS**

**Santa Maria, RS  
2018**



**Tábada Samantha Marques Rosa**

**O EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) NA INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E PREVENÇÃO DE SINTOMAS PARKINSONIANOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Distúrbios da Comunicação Humana**

**Orientador: Profº Dr. Aron Ferreira da Silveira**  
**Co-orientadora: Profª Drª. Ivana Beatrice Mânica da Cruz**

**Santa Maria, RS,  
2018**

Rosa, Tábada Samantha Marques

O EFEITO IN VITRO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS) NA INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E PREVENÇÃO DE SINTOMAS PARKINSONIANOS / Tábada Samantha Marques Rosa.- 2018.

135 p.; 30 cm

Orientador: Aron Ferreira da Silveira Coorientadora:  
Ivana Beatrice Mânica da Cruz Tese (doutorado) -  
Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, RS, 2018

1. Doença de Parkinson 2. Ilex paraguariensis 3.  
Inflamação 4. Estresse oxidativo 5. Neuroproteção I. da  
Silveira, Aron Ferreira II. da Cruz, Ivana Beatrice  
Mânica III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Tábada Samantha Marques Rosa. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Inconfidentes, n. 1521, apt 204, Bairro Nossa Senhora da Medianeira, Santa Maria, RS. CEP: 97015-290


Fone (055) 30252887; E-mail: [sa\\_marqs@hotmail.com](mailto:sa_marqs@hotmail.com)

**Tábada Samantha Marques Rosa**

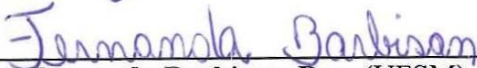
**O EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) NA INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E PREVENÇÃO DE SINTOMAS PARKINSONIANOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Distúrbios da Comunicação Humana**

**Aprovado em 03 de Maio de 2018:**

  
\_\_\_\_\_  
**Aron Ferreira da Silveira, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Silvio Teixeira da Costa, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Fernanda Barbisan, Dra. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Eduardo Bortoluzzi Dornelles, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Claudia Giulliano Bica, Dra. (UFCSPA)**

**SANTA MARIA, RS**

**2018.**



## DEDICATÓRIA

Dedico a minha tese de doutorado, esse sonho concretizado e muito importante pra mim para os meus avós, **Idê Marques da Silva e Antônio Francisco Carvalho da Silva**, por sempre acreditarem em mim e por entenderem a minha ausência. E para a pessoa que sempre esteve ao meu lado me apoiando e ajudando, meu esposo, **Lucas Sarturi**.





## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus por me dar sabedoria, força e fé para conseguir finalizar essa caminhada da melhor maneira possível.

Aos meus avós, Idê Marques da Silva e Antão Francisco Carvalho da Silva, que sempre me incentivaram a seguir meus estudos. E por me colocarem diariamente em suas orações.

Ao meu esposo, Lucas Carrier Sarturi, que esteve em todos os momentos ao meu lado. Que com todo o seu amor e carinho me ajudou muito, principalmente na finalização da tese. Sem você ao meu lado, este caminho se tornaria mais difícil.

Ao meu filho de quatro patas, Bob, que me faz ser uma pessoa melhor. Que é meu companheiro, amigo. Por seu amor incondicional diariamente.

Aos meus sogros, Antônio Alberi Sarturi e Dilvânia Carrier Sarturi, pelo incentivo e palavras de apoio. Por serem pessoas incríveis e que estiveram sempre comigo em todos os momentos, sendo minha segunda família.

Às minhas amigas, que o PPGDCH me deu, Joziane Lima e Mara Christmann. Muito obrigada por fazerem parte da minha trajetória e tornar o percurso mais fácil. Lembro quando na tentativa de iniciar o Mestrado, a Jozi nunca desistiu de mim, me ajudando na escrita de projetos. A nossas reuniões na casa da Mara que eram muito produtivas socialmente.

Em especial, A Fernanda Barbisan e a Verônica Azzolin, pelos ensinamentos primários, pela receptividade, pela parceria, paciência, dedicação, sem vocês eu não teria concretizado o doutorado. Vocês são pessoas maravilhosas!!

A minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra Ivana Mânica Beatrice da Cruz, que abriu as portas do Laboratório de Biogenômica e que idealizou esta pesquisa. Você é uma inspiração de ser humano a ser seguido.

Aos integrantes do Laboratório de Biogenômica, pela ajuda e concretização da minha pesquisa.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr Aron Ferreira da Silveira, pelos ensinamentos pessoais e profissionais, e pelas palavras de incentivo.

A Banca Examinadora, pelas contribuições científicas para este trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana



Você nunca sabe que resultados virão de sua ação.

Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.

Mahatma Gandhi.



## RESUMO

### **O EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) NA INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E PREVENÇÃO DE SINTOMAS PARKINSONIANOS**

AUTORA: Tábada Samantha Marques Rosa

ORIENTADOR: Aron Ferreira da Silveira

CO-ORIENTADORA: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença degenerativa do sistema nervoso central, crônica e progressiva. É causada por uma diminuição intensa da produção de dopamina. Essa doença é uma das principais causas de deficiência neurológica e sua prevalência ocorre em todo o mundo, o que justifica os esforços destinados a melhorar o seu tratamento. As substâncias naturais e de baixo custo, que possam atuar protegendo as células do estresse oxidativo, minimizando as alterações mitocondriais, da inflamação e apoptose, são fortes candidatas ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas de neuroproteção, em busca da melhora e da prevenção da DP. Estudos recentes revelaram uma associação inversa entre o consumo de erva-mate e o risco de desenvolver a DP, outros estudos, também indicaram uma associação entre a resposta inflamatória aumentada e a DP. O presente estudo foi desenvolvido com o extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), cultura *in vitro* das células SH-SY5Y e RAW 264.7. As células SH-SY5Y, para a análise, foram pré-tratadas com erva-mate e em seguida expostas a rotenona, indutor *in vitro* da DP, para verificar o efeito neuroprotetor da erva-mate nos sintomas parkinsonianos. E as células RAW 264.7, para a análise, foram pré-tratadas com Fitohemaglutinina e erva-mate, para verificar os marcadores inflamatórios e oxidativos. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Prédio 19, do Campus da Universidade Federal de Santa Maria. A atividade mitocondrial foi diminuída na linhagem RAW 264.7 e aumentada nas células SH-SY5Y, tratadas com extrato aquoso de erva-mate. A genotoxicidade não foi observada na exposição ao extrato aquoso de erva-mate, em ambas as células. Na apoptose, a linhagem RAW 264.7, demonstrou um aumento nos níveis de caspases 1, 3 e 8 nas maiores concentrações, porém, nas células SH-SY5Y ocorreu um aumento nas caspases 1 e 8, apenas em altas concentrações, e a caspase 3 aumentou em todos os tratamentos. Os dados confirmaram que o tratamento com Fitohemaglutinina induziu um estado proliferativo e com a erva-mate uma resposta anti-inflamatória. Nas células SH-SY5Y, os tratamentos com rotenona diminuíram a viabilidade celular de maneira dose-dependente. Quando a exposição da erva-mate ocorreu, antes do tratamento com rotenona, a tendência à apoptose é atenuada, indicando um efeito neuroprotetor. Conclui-se que em ambas as linhagens celulares a erva-mate, em geral, apresentou efeito anti-inflamatório. Sendo que, nas menores concentrações apresentou um efeito neuroprotetor, contra danos causados pela rotenona em células neuronais.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson. *Ilex paraguariensis*. Inflamação. Estresse oxidativo. Neuroproteção.



## ABSTRACT

### THE IN VITRO EFFECT OF WATER EXTRACT OF YERBA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS) IN INFLAMMATION, OXIDATIVE STRESS AND PREVENTION OF PARKINSONIAN SYMPTOMS

AUTHOR: Tábada Samantha Marques Rosa

ADVISOR: Aron Ferreira da Silveira

CO-ADVISOR: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Parkinson's disease (PD) is a degenerative disease of the central nervous system, chronic and progressive. It is caused by an intense decrease in dopamine production. This disease is one of the main causes of neurological deficiency and its prevalence occurs worldwide, which justifies efforts to improve its treatment. The natural and low cost substances that can act to protect cells from oxidative stress, minimizing mitochondrial changes, inflammation and apoptosis, are strong candidates for the development of new therapeutic approaches of neuroprotection, in search of improvement and prevention of PD. Recent studies have revealed an inverse association between consumption of yerba mate and the risk of developing PD, other studies have also indicated an association between increased inflammatory response and PD. The present study was developed with the aqueous extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis*), in vitro culture of SH-SY5Y and RAW 264.7 cells. The SH-SY5Y cells were pre-treated with mate and then exposed to rotenone, an in vitro PD inducer, for the analysis of the neuroprotective effect of yerba mate on parkinsonian symptoms. And the RAW 264.7 cells, for the analysis, were pretreated with phytohemagglutinin and yerba mate, to check the inflammatory and oxidative markers. The research was carried out in the Laboratory of Biogenomics, Department of Morphology, Building 19, Campus of the Federal University of Santa Maria. Mitochondrial activity was decreased in the RAW 264.7 strain and increased in SH-SY5Y cells treated with an aqueous mate extract. Genotoxicity was not observed on exposure to the aqueous extract of mate in both cells. In apoptosis, RAW 264.7 showed an increase in caspase levels 1, 3 and 8 at the highest concentrations, but in SH-SY5Y cells there was an increase in caspases 1 and 8, only at high concentrations, and caspase 3 increased in all treatments. The data confirmed that treatment with Phytohemagglutinin induced a proliferative state and with maté an anti-inflammatory response. In SH-SY5Y cells, rotenone treatments decreased cell viability in a dose-dependent manner. When yerba mate exposure occurred before rotenone treatment, the tendency to apoptosis is attenuated, indicating a neuroprotective effect. It was concluded that in both cell lines the mate-herb, in general, presented anti-inflammatory effect. At the lowest concentrations, the neuroprotective effect was observed against rotenone damage in neuronal cells.

**Keywords:** Parkinson's Disease. *Ilex paraguariensis*. Inflammation. Oxidative Stress. Neuroprotection.





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Ilustração das principais características clínicas e manejo clínico do paciente com DP.....	31
Figura 2 –	Esquema geral da associação entre alterações na estrutura da proteína $\alpha$ -sinucleína que leva a formação de fibrilas parecidas com as fibrilas beta-amilóides encontradas na demência de Alzheimer.....	34
Figura 3 –	Disfunção mitocondrial no complexo I com conseqüente redução na produção de ATP, aumento dos níveis de EROs e danos celulares observados no estado de estresse oxidativo celular.....	36
Figura 4 –	Sistema Antioxidante endógeno. Evidenciando o papel das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX, na detoxificação de Espécies Reativas de Oxigênio.....	37
Figura 5	Principais componentes orgânicos dos extratos de erva-mate.....	45
Figura 6 –	Evidência que aprova os efeitos benéficos de erva-mate em distúrbios lipídicos, obesidade e estresse oxidativo.....	47
Figura 7 –	Evidência que apoia os efeitos benéficos de erva-mate na inflamação e mutagênese.....	49
<b>MANUSCRITO 1</b>		
Figure 1 –	Effect on the cell proliferation of different concentrations of the aqueous extract of mate, in cells of rat macrophages (RAW-264.7). .....	69
Figure 2 –	Effect on the cell proliferation of different concentrations of the aqueous extract of mate, in neural cells (SH-SY5Y). .....	70
Figure 3 –	Genotoxic effect of yerba mate extract at different concentrations on mice macrophages (RAW 264.7) and neural cells (SH-SY5Y).....	71
Figure 4 –	Effect on the cellular apoptosis of yerba mate extract at different concentrations in mice macrophage (RAW 264.7) and neural cell (SH-SY5Y). .....	72
<b>MANUSCRITO 2</b>		
Figure 1 –	Cell viability analysis and protein levels of caspases 1, 3 and 8.....	86
Figure 2 –	Macrophage activation after 24 h of exposure to PHA. ....	86
Figure 3 –	Effect of the aqueous extract of <i>Ilex Paraguariensis</i> on the proinflammatory cytokines IL-1 and IL-6. ....	87
Figure 4 –	Effect of the aqueous extract of <i>Ilex Paraguariensis</i> on IL-10 an anti-inflammatory cytokine. ....	88
Figure 5-	Effect on the inflammatory response to PHA in 72 h cell cultures of RAW 264.7 macrophages.....	89
<b>MANUSCRITO 3</b>		
Figure 1 –	Cell viability analysis SH-SY5Y cells .....	120
Figure 2 –	Analysis of cellular apoptosis via caspase 3 and 8 gene expression, SH-SY5Y cells exposed to better concentration of <i>Ilex paraguarienses</i> (10 $\mu$ g / mL) and rotenone (40 $\mu$ M) and association. ....	121
Figure 3 –	Oxidative metabolism. SH-SY5Y cells exposed to the best concentrations of <i>Ilex paraguariensis</i> (10 $\mu$ g / mL) and rotenone (40 $\mu$ M) and association analyzed in 72 hours of treatment. ....	122
Figure 4 –	Oxidative metabolism SH-SY5Y cells.....	123



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais estágios da doença de Parkinson conforme área neurológica acometida.....	31
Tabela 2 – Tratamentos farmacológicos na Doença de Parkinson.....	41
Tabela 3 – Iniciadores utilizados para análise da expressão gênica.....	61
Tabela 4 – Iniciadores utilizados para análise da expressão gênica.....	62
MANUSCRITO 2	
Table 1 – Bioactive compounds concentration of hot-aqueous extract <i>Ilex paraguariensis</i> .....	85
MANUSCRITO 3	
Table 1 – Bioactive compounds concentration of hot-aqueous extract <i>Ilex paraguariensis</i> .....	119



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-Inflamatórios Não-Esteroides
AMPK	5' Adenosina Monofosfato Ativado Proteína Kinase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAT	Catalase
Casp 3	Caspase três
Casp 8	Caspase oito
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
Cu <sup>+2</sup>	Ions cobre
DCF	DicloroFluoresceína
DDPH	Difenil-1-picril-hidrazila
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNPH	Dinitrofenil-hidrazina
DP	Doença de Parkinson
EHG	Extrato Hidroalcoólico de Guaraná
EPR	Epitélio Pigmentar da Retina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
G	Gramas
GPX	Glutathione Peroxidase
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido Fosfórico
H	Hora
HOCl	Ácido Hipoclorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IL-1	Interleucina um
IL-6	Interleucina seis
IL-10	Interleucina dez

IP	Iodeto de Propídio
LDL	Low Density Lipoproteins
LPO	LipoPeroxidação
LPS	Lipopolissacarídeo
MC	Mitose Catastrófica
MDA	Malondialdeído
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MPP+	1-metil-4-phenylpyridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto
NF-K	Fator Nuclear Kappa
nm	Nanômetros
NO <sub>2</sub>	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
°C	Graus Celsius
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
ON	Óxido nítrico
PON1	Paraoxonase 1
PBS	Tampão fosfato
pH	Potencial de hidrogênio
PHA	Fitohemaglutinina
PINK1- PTEN	Induzida quinase putativa 1
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RL	Radicais Livres
RNA	Ácido Ribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SN	Sistema Nervoso
SOD	Superóxido Dismutase
S	Segundo

TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TFN- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TH	Tirosina Hidroxilase
TRAP	Total Radical Antioxidante Parâmetro
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
8-OHdG	8 hidroxí-2'-desoxiguanosina
$\alpha$ -syn	alfa-sinucleína





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	25
1.1. OBJETIVOS.....	26
<b>1.1.1. Objetivo geral</b> .....	26
<b>1.1.2. Objetivos específicos</b> .....	26
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	29
2.1. A DOENÇA DE PARKINSON E SEUS SINAIS E SINTOMAS .....	29
2.2. A FISIOPATOLOGIA NA DOENÇA DE PARKINSON.....	32
2.3. O ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DE PARKINSON .....	35
2.4. A INFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON.....	39
2.5. A DOENÇA DE PARKINSON E OS TRATAMENTOS DISPONÍVEIS .....	41
2.6. A ERVA MATE.....	43
2.7. EFEITOS BIOLÓGICOS DA ERVA-MATE .....	45
2.8. EFEITOS DOS EXTRATOS DE ERVA-MATE NA INFLAMAÇÃO.....	47
2.9. LINHAGEM DE MACRÓFAGOS (RAW 264.7) COMO MODELO <i>IN VITRO</i> DE INFLAMAÇÃO NO ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON .....	49
2.10.A LINHAGEM NEURONAL SH-5YSY COMO MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> NO ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	51
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	55
3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	55
3.2. LOCAL DA PESQUISA.....	55
3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	55
<b>3.3.1. Obtenção do extrato aquoso de Erva Mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)</b> .....	55
<b>3.3.2. Tratamento e cultivo <i>in vitro</i> das células SH-SY5Y</b> .....	55
<b>3.3.3. Tratamento e cultivo <i>in vitro</i> das células RAW 264.7</b> .....	56
<b>3.3.4. Avaliação do efeito no ciclo celular por citometria de fluxo</b> .....	57
<b>3.3.5. Ensaio MTT</b> .....	57
<b>3.3.6. Análise da apoptose celular por via das caspases</b> .....	58
<b>3.3.7. Parâmetros relacionados ao estresse oxidativo</b> .....	58

3.3.7.1. Atividade das Enzimas antioxidantes .....	58
3.3.7.2. Teste da Diclorofluoresceínadiacetato (DCFH-DA) .....	58
3.3.7.3. Avaliação da Peroxidação Lipídica/ Ensaio TBARS .....	59
3.3.7.4. Carbonilação de proteínas.....	60
3.3.7.5. Quantificação de superóxido .....	60
3.3.7.6. Análise da expressão gênica via das enzimas antioxidantes via qRT-PCR.....	60
<b>3.3.8. Parâmetros relacionados à inflamação .....</b>	<b>61</b>
3.3.8.1. Níveis de citocinas .....	61
3.3.8.2. Análise da expressão gênica via das citocinas via qRT-PCR.....	62
3.3.8.3. Análise dos dados .....	62
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
4.1. MANUSCRITO – 1 .....	63
4.2. MANUSCRITO – 2 .....	77
4.3. MANUSCRITO – 3 .....	98
<b>5. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>125</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>129</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>131</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma enfermidade crônica, degenerativa e progressiva do Sistema Nervoso Central (SNC), resultante da morte dos neurônios geradores de dopamina da substância negra, portanto provocando a redução das células fornecedoras de dopamina na via nigroestriatal e dos neurônios abrangendo neuromelanina no tronco cerebral (SOUZA, 2011). O seu diagnóstico baseia-se em sintomas clínicos, como a presença de uma síndrome rígida hipocinética caracterizada pelos quatro sinais motores cardinais: bradicinesia, tremor de repouso, rigidez muscular, instabilidade postural (RÍOS *et al.*, 2016).

Além disso, o metabolismo do neurotransmissor dopamina é também de extrema importância para a produção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). A degradação espontânea da dopamina resulta na produção de espécies reativas como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion hidroxila ( $OH^-$ ) e quinonas reativas, que são potencialmente tóxicos para os neurônios (ASANUMA *et al.*, 2004; BISAGLIA *et al.*, 2014). Uma evidência crescente sugere que a DP pode ser associada com a disfunção mitocondrial através de uma variedade de vias, incluindo a geração de EROs, na disfunção do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e na inflamação (ARAUJO, 2015).

A DP continua sendo umas das principais causas de deficiência neurológica e sua prevalência ocorre em todo o mundo, em todos os grupos étnicos, o que justifica os esforços destinados a melhorar o seu tratamento. Entretanto, até o momento não foi encontrado uma terapêutica definitiva que melhore ou impeça, de forma efetiva, a progressão desta doença, sendo que, as drogas utilizadas atualmente no tratamento da DP são apenas sintomáticas, uma vez que nenhuma delas faz desaparecer a degeneração neuronal (HALLIWELL, 2006). Desta forma, substâncias naturais e de baixo custo que possam atuar protegendo as células do estresse oxidativo, minimizando as alterações mitocondriais, da inflamação e apoptose, são fortes candidatas ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas de neuroproteção, em busca da melhora e da prevenção.

Alguns estudos epidemiológicos revelaram uma associação inversa consistente entre o consumo de bebidas com cafeína, como café (QUI e LI, 2014; LUDWIG *et al.*, 2014), erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (GATTO *et al.*, 2015) ou chá (QUI e LI, 2014) e o risco da DP. No atual estudo, iremos considerar a Erva-mate. A mesma contém componentes bioativos tais como: os extratos verdes (não torrados) que contêm purina, Alcalóides (metilxantinas), flavonóides, vitamina A, complexo B, C e E, taninos, ácido clorogênico e seus derivados, e as matesaponinas (MARTINET *et al.*, 2001; BASTOS *et al.*, 2007; HECK e MEJIA, 2007;

MENINI *et al.*, 2007). Entre seus principais efeitos atuam nas propriedades antioxidantes utilizadas em modelos químicos e *in vivo* de estudos de lipoproteína, propriedades de vasodilatação e redução de lipídios, efeitos mutagênicos *versus* antimutagênicos, associação controversa com câncer orofaríngeo, efeitos anti-glicação, propriedades de redução de peso (BRACESCO *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2008; PUANGPRAPHANT e DE MEJIA, 2009; LORIA *et al.*, 2009; FILIP *et al.*, 2010; BRACESCO *et al.*, 2011), efeitos anti-inflamatórios e imuno-moduladores (ZUIN *et al.*, 2005, SCHUBERT *et al.*, 2007). Existem evidências que indicam uma associação entre a resposta inflamatória aumentada e a DP, dessa forma está se tornando cada vez mais evidente que o estudo da inflamação é de primordial importância para elucidar os mecanismos de perda de neurônios dopaminérgicos na DP e desenvolver estratégias adequadas para reduzir os danos neuronais (STOJKOVSKA, WAGNER e MORRISON 2015).

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* do extrato aquoso de erva mate na inflamação, estresse oxidativo e prevenção de sintomas parkinsonianos.

### 1.1.2. Objetivos específicos

#### Manuscrito 1

Avaliar o efeito proliferativo e genotóxico de diferentes concentrações do extrato aquoso de erva- mate em células neuronais (SH-SY5Y) e em macrófagos (RAW 264.7) através da análise da:

- Proliferação celular (via teste MTT);
- Genotoxicidade (via teste 8-OHdG);
- Marcadores de apoptose celular por via das caspases (via teste imunoensaio);

#### Manuscrito 2

Avaliar o efeito do extrato aquoso de erva mate em um modelo *in vitro* anti-inflamatório utilizando a linhagem de células RAW 264.7 através da análise de:

- Viabilidade e Proliferação celular (via teste MTT);
- Marcadores de apoptose celular por via das caspases (via teste imunoenensaio);
- Marcadores inflamatórios (níveis das citocinas pelo teste imunoenzimático ELISA e a expressão gênica por qRT-PCR).

### **Manuscrito 3**

Analisar o efeito neuroprotetor do extrato aquoso de erva-mate em um modelo *in vitro* da Doença de Parkinson através da análise de:

- Viabilidade celular (via teste MTT);
- Marcadores de apoptose celular por via das caspases (via teste imunoenensaio);
- Marcadores oxidativos (via teste DCFH-DA; Produção de Superóxido; Peroxidação dos Lipídios; Carbonilação das Proteínas; SOD, CAT e GPX);
- Marcadores de genotoxicidade (via teste 8-OHdG).



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1.A DOENÇA DE PARKINSON E SEUS SINAIS E SINTOMAS

A DP é uma doença neurodegenerativa crônica caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra que leva à diminuição dos níveis de dopamina no corpo estriado e ao término do controle motor (ELBAZ *et al.*, 2016; TYSNES & STORSTEIN, 2017). O seu diagnóstico baseia-se em sintomas clínicos entre eles o tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e a instabilidade postural (CHAUDHURI *et al.*, 2015). E os sintomas não motores da DP incluem problemas neuropsiquiátricos (comprometimento cognitivo, ansiedade, depressão, psicose, distúrbios compulsivos e apatia), manifestações autonômicas (problemas intestinais, como constipação, queixas urinárias e disfunção sexual), distúrbios do sono, fadiga e sintomas sensoriais (BOSTANTJOPOULOU *et al.*, 2013).

A DP também é considerada a segunda morbidade neurodegenerativa mais frequente associada ao avanço da idade (MICHEL *et al.*, 2016). Sua incidência é geralmente compreendida entre 10 e 50 /100.000 pessoas-ano, e sua prevalência entre 100 e 300 /100.000 habitantes, sendo que ainda a prevalência aumenta progressivamente após os 60 anos de idade (PRINGSHEIM *et al.*, 2014).

A *World Health Organization* (2015), caracteriza a DP como multifatorial e pode ser resultado de uma pré-disposição genética que possivelmente interage com fatores ambientais. Segundo Pereira & Garrett (2010) a etiologia é considerada como idiopática, mas estudos acreditam que a DP pode ser decorrente de um conjunto de fatores, sejam eles toxinas ambientais, estresse oxidativo, fatores genéticos, anormalidades mitocondriais e/ou alterações associadas ao envelhecimento. Os fatores das toxinas ambientais estão interligados aos pacientes de DP que vivem em zona rural, fazem uso de água de poço e que estão mais expostos a pesticidas e herbicidas. As questões químicas procedem de exposições a produtos químicos industriais, como manganês, mercúrio e solventes.

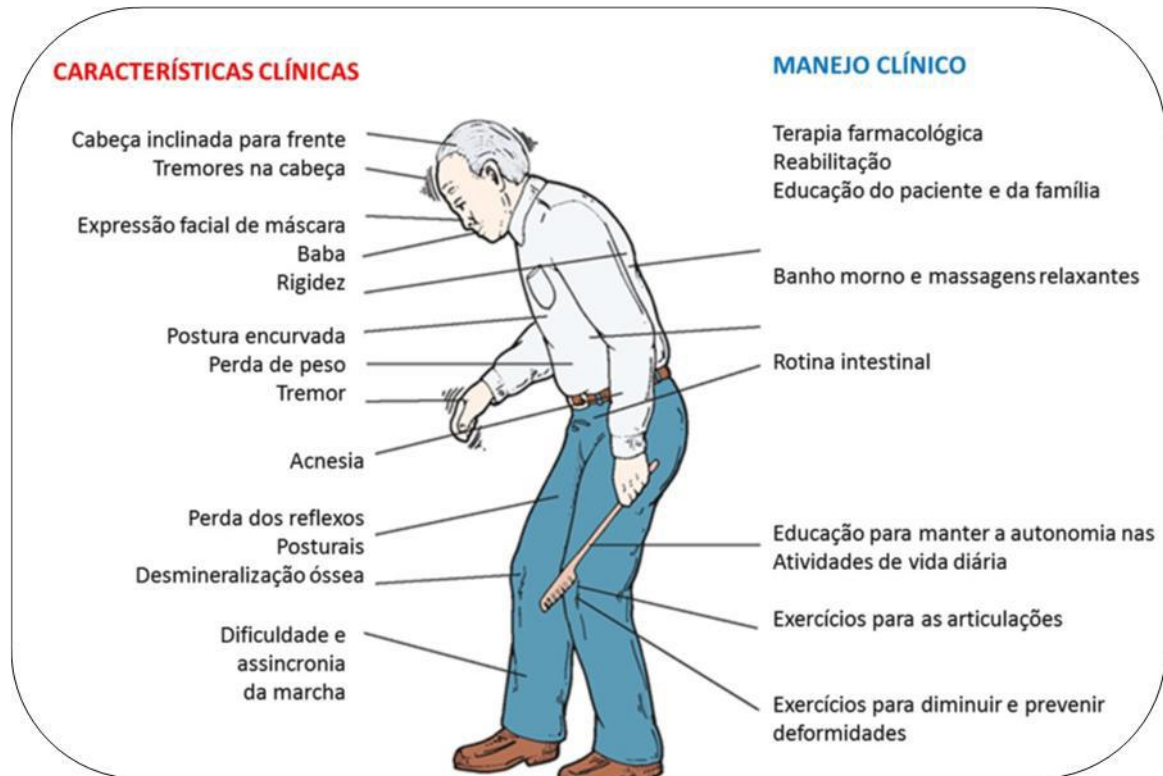
O estresse oxidativo, ocorre quando existe um desequilíbrio entre os fatores que promovem a formação de EROs e os mecanismos de defesas antioxidantes. As questões genéticas estão ligadas a existência de genes que favorecem o desenvolvimento da enfermidade, porém agindo de forma indireta. E as disfunções mitocondriais, podem ser decorrentes de fatores tóxicos, bem como genéticos, que tendem a ocasionar uma cascata de eventos originando morte celular programada, a chamada apoptose (TEIVE, 2005; PEREIRA e GARRETT, 2010).

Com a progressão da DP, os indivíduos apresentam distúrbios progressivos no equilíbrio, na postura e na marcha (MORRIS, 2000), além de prejuízos na execução das atividades de vida diária e mobilidade (SOUZA *et al.*, 2007; CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2010). Segundo Nocera *et al.* (2010), os indivíduos frequentemente apresentam redução na força muscular e instabilidade postural, o que aumenta o risco de quedas. As quedas ocorrem devido à incapacidade de realizar movimentos compensatórios, para readquirir a estabilidade estática e dinâmica do corpo (CHRISTOFOLETTI, 2010). Ainda pode-se citar que a maior parte dos pacientes com DP apresentam uma interação deficitária dos sistemas responsáveis pelo equilíbrio corporal e, por conseguinte, tendem a deslocar o centro de gravidade para frente (CHASTAN *et al.*, 2009). De maneira que os distúrbios da marcha e a instabilidade postural são limitações comuns nos portadores da DP, sendo sua prevalência e severidade aumentadas com a progressão da doença (MARINHO, CHAVES e TARABA, 2014).

Uma síntese dos principais sintomas e manejo clínico do paciente com DP é apresentada na Figura 1. Em geral, os sintomas da DP incluem tremor em repouso, bradicinesia, rigidez e anormalidades posturais entre outros. Os pacientes com DP, com frequência apresentam estados depressivos (FERRI-DE-BARROS, 2012). Além disto, 80% dos indivíduos evoluem para estados de demência (WALKER *et al.*, 2015). Indivíduos parkinsonianos podem também apresentar alterações de voz, articulações e deglutição que vêm a comprometer atividades de comunicação e alimentação de tais sujeitos (AZEVEDO, CARDOSO, REIS, 2003).



Figura 1 – Ilustração das principais características clínicas e manejo clínico do paciente com DP.



Fonte: <http://www.senioresl.com/2013/04/researchers-hunt-for-clues-about.html>

A DP é também subdividida em estágios conforme as áreas cerebrais acometidas, de forma a compreender e unificar as características da progressão da doença, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais estágios da doença de Parkinson conforme área neurológica acometida (continua)

Estágios	Especificação
I	Comprometimento do núcleo motor dorsal dos nervos glossofaríngeo e vago, além da zona reticular intermediária e do núcleo olfatório anterior, constituindo assim um processo neurodegenerativo quase que totalmente localizado nas fibras dopaminérgicas que inervam o putâmen dorso-lateral;
II	Comprometimento adicional dos núcleos da rafe, núcleo reticular gigante celular e do complexo do lócus cerúleos;

Tabela 1 – Principais estágios da doença de Parkinson conforme área neurológica acometida (conclusão)

III	Acometimento da parte compacta da substância negra do mesencéfalo;
IV e V	Comprometimentos das regiões proencefálicas, do mesocórtex temporal e de áreas de associação do neocórtex e neocórtex pré-frontal, respectivamente
VI	Comprometimento de áreas de associação do neocórtex, áreas pré-motoras e área motora primária.

Fonte: adaptado de Souza *et al.* (2011).

## 2.2. A FISIOPATOLOGIA NA DOENÇA DE PARKINSON

Como observado na Tabela 1 a DP está diretamente relacionada com processos neurodegenerativos progressivos. Esta doença é caracterizada pela ocorrência de disfunções monoaminérgicas múltiplas que levam a uma função deficiente do sistema dopaminérgico, colinérgico, serotoninérgico e noradrenérgico (GARCIA-PTACEK e KRAMBERGER 2016).

A doença é causada por alterações bioquímicas estriatais, principalmente por desbalanço entre atividade colinérgica e atividade dopaminérgica nestas regiões. Estas alterações levam a destruição dos neurônios da substância negra, e em consequência ocorre menor atividade dopaminérgica o que causa os sintomas clínicos do Parkinson (FERRI-DE-BARROS, 2012).

Como foi anteriormente comentado, nos indivíduos que apresentam esta doença, a substância negra, perde neurônios dopaminérgicos que se projetam em direção ao estriado. Estes neurônios, na realidade são críticos para o processamento da informação pelos gânglios da base o que acaba reduzindo a atividade das áreas motoras do córtex cerebral. Esta redução tem como consequência a diminuição dos movimentos voluntários (WALKER *et al.*, 2015). A degeneração da doença que vai aumentando conforme ela progride leva ao aparecimento de estruturas dentro das células neuronais conhecidas como corpos de Lewys (WALKER *et al.*, 2015).

Este acúmulo pode levar a estados de demência relacionados à DP. Estima-se que 7,6% dos casos diagnosticados com demência estão associados à presença de corpos de Lewys intracelulares (WALKER *et al.*, 2015), os quais são produzidos pelo acúmulo de proteínas anormais dentro dos neurônios, em especial a alfa-sinucleína ( $\alpha$ -syn) (MICHEL *et al.*, 2016).

Em 1997, um estudo demonstrou que indivíduos com DP apresentam uma alteração no gene da proteína  $\alpha$ -syn. Dessa forma, foi demonstrada a correlação genética como papel

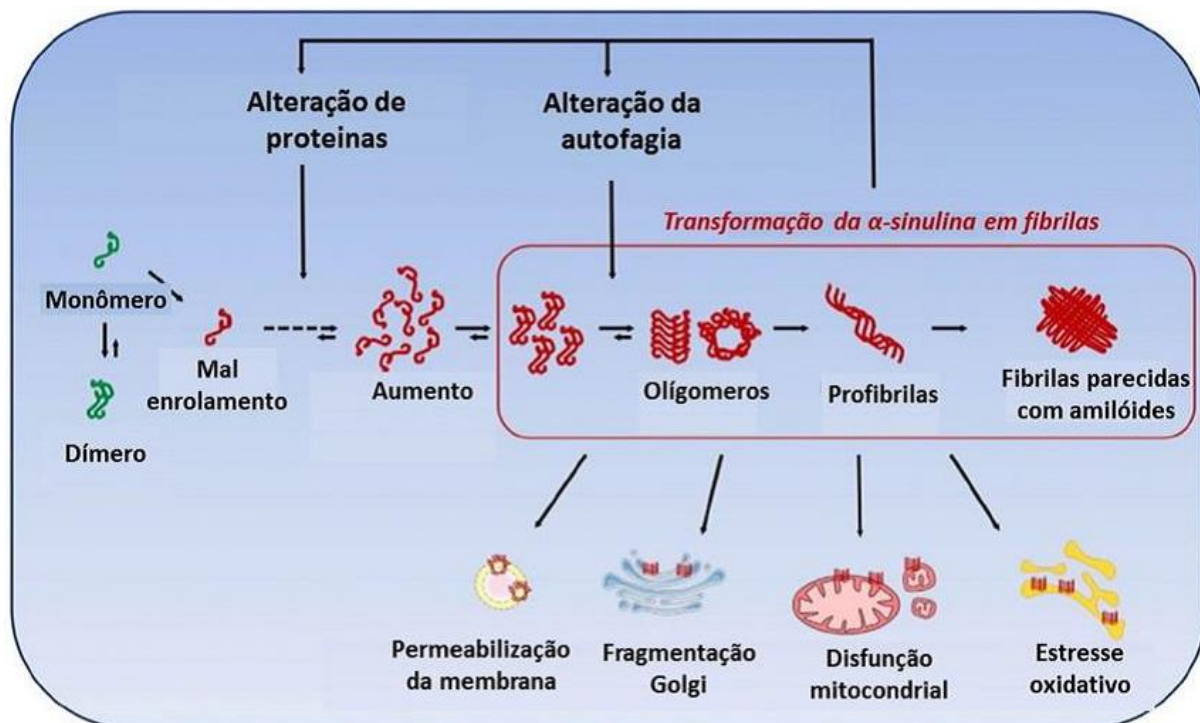
determinante de extrema relevância no risco ao desenvolvimento da DP, em virtude do aumento da expressão gênica de tal proteína (SIMÓN-SÁNCHEZ *et al.*, 2009).

A  $\alpha$ -syn é uma proteína pequena com 140 aminoácidos e presente nos compartimentos pré-sinápticos, regulando os processos de dinâmica e movimentação das vesículas e liberação de neurotransmissores. Estudos *in vivo* vêm demonstrando que a deficiência da  $\alpha$ -syn compromete a liberação da dopamina no estriado (ALBELIOVICH *et al.*, 2000; BURRÉ *et al.*, 2010).

A  $\alpha$ -syn é a proteína mais abundante do cérebro humano, também sendo encontrada em menor quantidade no coração, músculos e outros tecidos. Esta proteína é expressa principalmente em neurônios do neocórtex, hipocampo, Sistema Nervoso (SN), tálamo e cerebelo em estruturas especializadas denominadas terminais pré-sinápticos. Estudos sugerem que esta proteína também pode estar localizada dentro de mitocôndrias neuronais (ZHANG *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009).

Após a síntese da proteína  $\alpha$ -syn a mesma deve se agrupar tridimensionalmente para formar uma proteína funcional (estrutura terciária). O mal-enrolamento faz com que ocorra a produção de proteínas alteradas. Em situações em que a proteína não é funcional, a sua expressão aumenta ocorrendo acúmulo destas proteínas alteradas que se ligam e dão origem as fibrilas (Figura 2). Este processo de transformação da  $\alpha$ -syn em fibrilas aumenta a permeabilização da membrana dos neurônios, modificando assim a entrada e saída de moléculas importantes para a sua função (ZHANG *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009; GARCIA-PTACEK e KRAMBERGER, 2016).

Figura 2 – Esquema geral da associação entre alterações na estrutura da proteína  $\alpha$ -sinucleína que leva a formação de fibrilas parecidas com as fibrilas beta-amilóides encontradas na demência de Alzheimer.



Fonte: adaptado de Michel e colaboradores (2016).

Ocorre fragmentação do complexo de Golgi que está associada à secreção e armazenamento de moléculas que são importantes para a função neural. Além disto, a mitocôndria fica com a sua função afetada produzindo menor quantidade de energia (síntese de adenosina trifosfato- ATP) e maior concentração de EROs, em especial o  $O_2^-$ . A produção de maior quantidade de EROs aumenta o estresse oxidativo ocorrendo lipoperoxidação das membranas das organelas, carbonilação de proteínas e também dano ao DNA, como consequência deste desbalanço celular (Figura 2) (MICHEL *et al.*, 2016).

Adicionalmente, no interior dos neurônios, a  $\alpha$ -sinucleína interage com fosfolipídios e proteínas. Esta interação é importante para a função dos terminais pré-sinápticos que contem vacúolos (vesículas sinápticas) com diferentes neurotransmissores que possuem função de biossinalização. Apesar da função específica da  $\alpha$ -sinucleína não ser completamente compreendida, alguns estudos sugeriram que esta proteína tem um papel importante na manutenção das vesículas sinápticas nos terminais pré-sinápticos, porque ajuda a agrupar as vesículas. Parece que também auxiliam na regulação da liberação da dopamina, que é um tipo

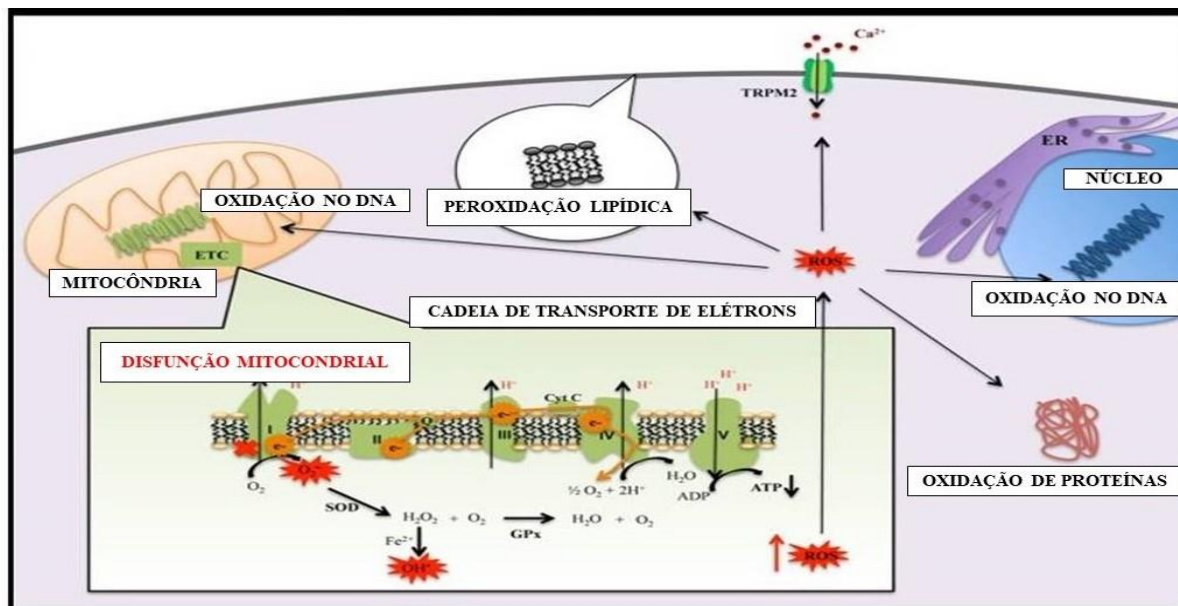
de neurotransmissor crítico no controle e início dos movimentos voluntários e involuntários (WIRDEFELDT *et al*, 2011).

Seguindo o mesmo contexto, Noyce e colaboradores (2012) em um estudo epidemiológico mostraram que o uso de medicamentos Anti-Inflamatórios Não-Esteroides (AINEs), reduziu o risco de desenvolver a DP, apoiando a hipótese de que a inflamação pode promover um processo de doença subjacente. A neuroinflamação é uma característica da patologia da DP, mas ela ainda tem que ser estabelecida se a neuroinflamação promove ou protege a neurodegeneração. O aumento significativo no nível de componentes imunes inatos, incluindo as citocinas (IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), na substância negra e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com DP tem sido observado (LIU, GAO e HONG, 2003). Benkler e colaboradores (2012) também encontraram evidências sugerindo que um mecanismo auto-imune, pode ser mediado através de respostas humorais, por desempenhar um papel na fisiopatologia da DP.

### 2.3.O ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DE PARKINSON

Em indivíduos com DP vêm sendo descrita uma alteração expressiva a nível de mitocôndria, principalmente com característica disfunção no complexo mitocondrial I. Por esse complexo ser a estrutura inicial da cadeia de transporte de elétron, sua disfunção acarreta significativa redução da produção de ATP e aumento do estresse oxidativo, que será comentado posteriormente (KIM *et al*, 2015), assim como esquematizado na Figura 3.

Figura 3 – Disfunção mitocondrial no complexo I com consequente redução na produção de ATP, aumento dos níveis de EROs e danos celulares observados no estado de estresse oxidativo celular.



Fonte: adaptado de Machado e colaboradores (2016).

As EROs são espécies químicas e extremamente reativas, capazes de causar danos em células e conseqüentemente nos sistemas biológicos (COTINGUIBA *et al.*, 2013). Embora múltiplos fatores possam causar o estresse oxidativo nas células, o neurotransmissor excitatório glutamato é o maior indutor deste processo no SNC. O glutamato é um neurotransmissor essencial que ativa diferentes receptores, entre os quais o receptor n-metil-d-aspartato. Este é um receptor ionotrópico, cujo o estímulo provoca a abertura do canal de cálcio e conseqüentemente aumento do cálcio intracelular. Em situações em que há aumento excessivo deste íon, devido ao estímulo do receptor n-metil-d-aspartato, pode ocorrer um aumento na formação de EROs esse processo é conhecido por excitotoxicidade (GILGUN *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2014).

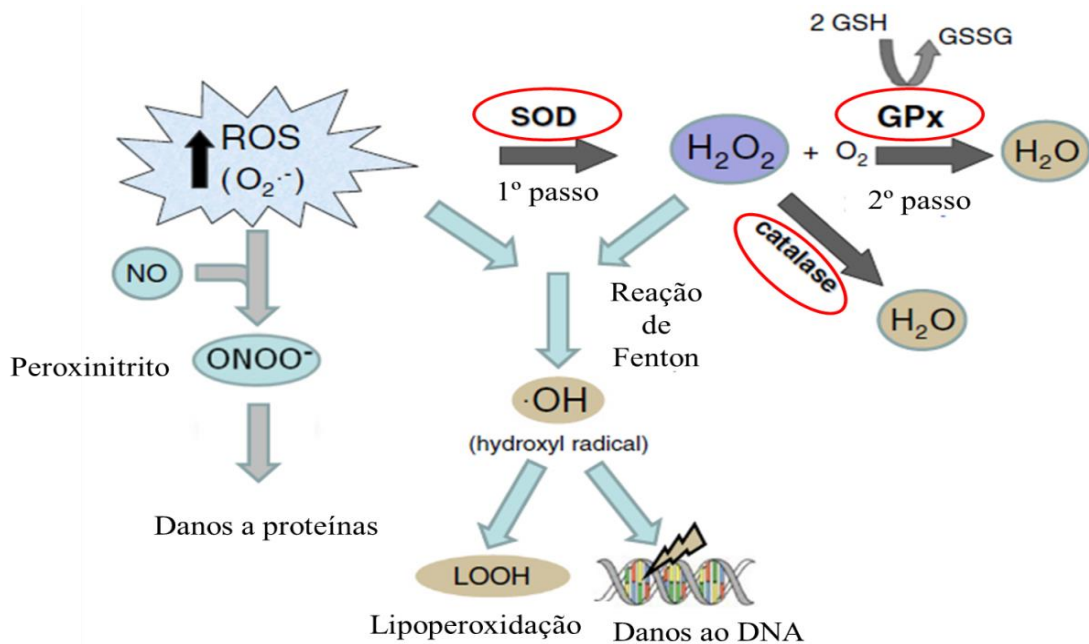
Além disso, o metabolismo do neurotransmissor dopamina é também de extrema importância para a produção das EROs. A degradação espontânea da dopamina resulta na produção de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  e quinonas reativas, que são potencialmente tóxicos para os neurônios (ASANUMA *et al.*, 2004; BISAGLIA *et al.*, 2014).

As EROs são fundamentais para a sobrevivência dos organismos vivos por participarem de processos de defesa, entretanto, seu excesso pode produzir danos celulares irreversíveis. Nosso organismo conta com 2 sistemas principais de defesa antioxidante: o exógeno e um

endógeno. O sistema exógeno é adquirido via alimentação através do consumo de moléculas bioativas, essas moléculas ainda contribuem para o melhor funcionamento do sistema endógeno, que é composto por enzimas antioxidantes com destaque para: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPX).

Esse sistema de defesa antioxidante enzimático, principal forma de defesa contra as EROs, tem por finalidade catalisar reações para neutralizar as EROs, produzidos durante o metabolismo da respiração aeróbica e a oxidação de substrato. A primeira linha de defesa da célula contra o excesso das EROs tem a ação detoxificadora dos agentes oxidantes, antes que eles causem lesões. É constituída pela SOD, que catalisa a reação de  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ , por sua vez a CAT, a glutathiona reduzida e a GPX catalisam a degradação de  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ). Essas enzimas são capazes de neutralizar os agentes oxidantes, e mantê-los em níveis adequados no organismo (TRABER, 1997; BYSTROM *et al.*, 2014; URBANSKA *et al.*, 2014). O estresse oxidativo se instaura quando há uma queda no sistema de defesa enzimático, ou um aumento na produção de EROs, ou ainda na associação entre esses dois fatores como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 – Sistema antioxidante endógeno. Evidenciando o papel das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX, na detoxificação de Espécies Reativas de Oxigênio.



Fonte: adaptado de Rosenfeldt e colaboradores (2013)

Durante o envelhecimento fisiológico do cérebro ocorre uma diminuição das enzimas SOD e CAT, levando a um aumento dos EROs e apoptose dos neurônios dopaminérgicos

(CARDOSO *et al.*, 2012). O SNC possui uma quantidade reduzida de antioxidantes e altas quantidades de lipídeos, tornando propenso o ataque de EROs. De modo que, os principais causadores de danos ao SNC são as EROs. Por exemplo, a SOD, CAT e GPX são enzimas cerebrais importantes e o aumento da atividade dessas enzimas pode melhorar a DP, devido à ação antioxidante (MANSOURI *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo está intimamente associado ao processo da morte celular por apoptose. As EROs têm sido consideradas como pré-requisito para o processo apoptótico e o estresse oxidativo teria assim, um papel central neste processo (CHANDRA, SAMALI e ORRENIUS, 2000; SINHA *et al.*, 2013). Além disso, o estresse oxidativo tem sido atribuído como um fator importante na progressão da DP (MUÑOZ-SORIANO e PARICIO, 2011). Uma evidência crescente sugere que a DP pode ser associada com a disfunção mitocondrial através de uma variedade de vias, incluindo a geração de EROs, disfunção do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e inflamação (ARAUJO, 2015).

Sabendo que o estresse oxidativo desempenha um papel central na DP, numerosos estudos têm sido realizados para investigar o potencial efeito neuroprotetor da ação de antioxidantes baseados nos modelos de DP. Apesar de vários antioxidantes sintéticos estarem disponíveis, uma tendência crescente alvo é a utilização das plantas medicinais e alimentos como antioxidantes (HATZIAGAPIOU *et al.*, 2018; SASHOURPOUR *et al.*, 2017; AYOUBI *et al.*, 2017; ABBAOUI *et al.*, 2017; SUDATI, 2013).

Além disso, o envolvimento de processo neuroinflamatório com ativação de células da glia e liberação de citocinas e Óxido Nítrico (ON), também têm sido frequentemente mencionados em pacientes portadores de doenças neurodegenerativas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014). Estes resultados indicam claramente que o processo de neurodegeneração é multifatorial. Apesar de ainda não ser conhecido qual o evento inicial determinante deste processo, segundo Halliwell (2001, 2002 e 2006), estes eventos constituem um ciclo vicioso que poderia ser iniciado por qualquer um deles tendo como resultado final a morte neuronal.

O estresse oxidativo parece ser uma parte importante e não facilmente separada da resposta inflamatória. Por exemplo, a resposta inflamatória cria um ambiente de estresse oxidativo aumentado e as evidências experimentais sugerem que a susceptibilidade aumentada ao dano oxidativo leva a uma resposta inflamatória aumentada (STOJKOVSKA, WAGNER e MORRISON 2015). Dessa forma, o estresse oxidativo e a inflamação parecem ser processos que se retroalimentam.



## 2.4.A INFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON

Uma ligação entre a inflamação e a DP foi inicialmente fornecida em um estudo por McGeer e colaboradores (1988), no qual o SN dos pacientes com DP apresentava a micróglia ativada. Na sequência, vários estudos clínicos confirmaram essa associação relatando o aumento da ativação microglial e quantidade elevada de citocinas pró-inflamatórias em cérebros após a morte (DUKE *et al.*, 2007; TAYLOR *et al.*, 2013). Esses achados são respaldados por evidências epidemiológicas que indicam uma menor ocorrência de DP com o uso contínuo de AINEs (CHEN *et al.*, 2003; WAHNER *et al.*, 2007; RESS *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2011), embora, esta afirmação permaneça controversa (HERNÁN *et al.*, 2006; HANCOCK *et al.*, 2007), esses estudos indicam que a intervenção anti-inflamatória precoce pode ser uma estratégia útil para prevenir a DP. Como, no caso, o estudo de Gao *et al.* (2011) que identificaram 291 casos de DP incidente durante 6 anos de seguimento. Os usuários de ibuprofeno tiveram um risco de DP significativamente menor do que os não usuários (risco relativo [RR], ajustado para idade, tabagismo, cafeína e outras covariantes = 0,62; intervalo de confiança de 95% [IC] 0,42-0,93;  $p = 0,02$ ). Houve uma relação dose-resposta entre os comprimidos de ibuprofeno ingeridos por semana e o risco de DP (tendência  $p = 0,01$ ). Em contraste, o risco de DP não foi significativamente relacionado ao uso de aspirina (RR = 0,99; IC 95% 0,78-1,26), outros AINEs (RR = 1,26; IC 95% 0,86-1,84). O estudo concluiu que a associação entre o uso de ibuprofeno e menores riscos de DP, não compartilhada por outros AINEs ou paracetamol, sugere que o ibuprofeno deve ser investigado como um potencial agente neuroprotetor contra DP.

Outra pesquisa realizou um estudo de caso-controle em 93 pares de gêmeos para o desenvolvimento da DP. Os resultados sugerem que a lesão cefálica leve a moderada pode aumentar o risco de DP décadas mais tarde. (GOLDMAN *et al.*, 2006). Da mesma forma, a rinite alérgica, vulgarmente associada com a inflamação da via aérea nasal, exibe ligação a um aumento da incidência da DP (BOWER *et al.*, 2006). Os modelos pré-clínicos da DP também sugerem que a inflamação é uma força motriz na diminuição de neurônios dopaminérgicos. Por exemplo, a injeção intraperitoneal ou intranasal crônica de Lipopolissacárido bacteriano (LPS) provoca uma resposta imunitária sistêmica e conduz à perda de neurônios dopaminérgicos e ao desenvolvimento da DP em ratos (QIN *et al.*, 2007; FRANK-CANNON *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2013).

Esses modelos inflamatórios da DP sugerem estresse inflamatório periférico e sistêmico que pode se manifestar como a perda de neurônios dopaminérgicos, provavelmente, através da

infiltração de leucócitos periféricos. Outra evidência também sugere que a DP na modelagem de neurotoxinas, como MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina), pode facilitar a diminuição de neurônios dopaminérgicos, pelo menos em parte, por indução da resposta inflamatória (RAMSEY *et al.*, 2014). Além disso, em ratos, a inflamação aumentada tem sido demonstrada para recapitular a agregação da  $\alpha$ -sinucleína e a oxidação em neurônios afetados (QIN *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2013; RAMSEY *et al.*, 2014).

Um estudo, realizado por meio de um Banco de Dados da Saúde Nacional, da cidade de Taiwan, República da China, teve como objetivo avaliar o efeito da suspensão da terapia com estatinas na incidência da DP em usuários de estatinas. Fizeram parte do estudo indivíduos sem o diagnóstico da DP e que iniciaram o tratamento com estatinas, entre os anos de 2001 a 2008. Foi observado a associação entre a interrupção do uso de estatinas e a incidência da DP. A utilização de estatinas foi ainda classificada, de acordo, com as características farmacocinéticas: sinvastatina, lovastatina, fluvastatina e atorvastatina devido serem moléculas lipofílicas. Considerando ainda, que a pravastatina e a rosuvastatina são mais hidrofílicas foi definido a descontinuação da terapia com estatina se nenhuma medicação estivesse disponível. Os resultados revelaram que entre os 43.810 usuários de estatinas, a taxa de incidência para DP foi de 1,68 e 3,52 por 1.000.000 pessoas-dia para estatinas lipofílicas e hidrofílicas, respectivamente. A continuação de estatinas lipofílicas foi associada com um risco reduzido de DP (razão de risco [RR] 0,42 [intervalo de confiança de 95% 0,27-0,64]) em comparação com a interrupção da estatina, que não foi modificada por comorbidades ou medicamentos. Não houve associação entre estatinas hidrofílicas e ocorrência de DP. Entre as estatinas lipofílicas, uma associação significativa foi observada para sinvastatina (HR 0,23 [0,07-0,73]) e atorvastatina (HR 0,33 [0,17-0,65]), especialmente em mulheres (HR 0,11 [0,02-0,80] para sinvastatina; HR 0,24 [0,09-0,64] para atorvastatina). Quanto aos usuários de atorvastatina, o efeito benéfico foi observado no subgrupo de idosos (HR 0,42 [0,21-0,87]). Os autores concluíram que a continuação da terapia com estatinas lipofílicas foi associada com uma diminuição da incidência de DP em comparação com a descontinuação dos usuários de estatina, especialmente em subgrupos de mulheres e idosos. Um estudo de acompanhamento a longo prazo é necessário para esclarecer o potencial papel benéfico das estatinas lipofílicas na DP (LEE *et al.*, 2013).

Outra pesquisa cita uma redução de 23% na incidência de DP entre usuários de estatina, sugerindo que esta classe de drogas pode não só ser benéfica para doença arterial coronária, mas também contra DP (FRIEDMAN *et al.*, 2013). Assim, está se tornando cada vez mais evidente que o estudo da inflamação é de primordial importância para elucidar os mecanismos

de perda de neurônios dopaminérgicos na DP e desenvolver estratégias adequadas para reduzir os danos neuronais (STOJKOVSKA, WAGNER e MORRISON 2015).

## 2.5.A DOENÇA DE PARKINSON E OS TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

Embora a DP não tenha cura, existem tratamentos disponíveis que diminuem e controlam os sintomas motores e melhoram a qualidade de vida dos pacientes. Segundo a revisão recente feita por Muzerengi e Clarke (2015) diversas classes de fármacos têm sido licenciadas e são utilizadas na monoterapia do estágio inicial desta doença. A tabela 2 apresenta uma síntese dos principais tipos de terapias farmacológicas.

Tabela 2 – Tratamentos farmacológicos na Doença de Parkinson

(continua)

Fármacos	Efeitos principais
Levodopa	É o principal fármaco utilizado no tratamento do Parkinson. Precursor da síntese da dopamina. Tem sido utilizado durante décadas no tratamento dos sintomas da doença
Agonistas da dopamina	Representam uma classe de fármacos que possuem ação similar a dopamina. Se ligam diretamente aos receptores pós-sinápticos da dopamina presentes no núcleo estriado. Estes incluem o dicloridrato de pramipexol, ropinirola, rotigotina, cabergolina, bromocriptina e pergolida.
Inibidores da monoaminaoxidase	Como a dopamina é degradada por enzimas como a monoamina oxidase, o uso de inibidores da monoamina oxidase são utilizados farmacologicamente no tratamento do Parkinson. O aumento dos níveis de dopamina auxilia a diminuir os efeitos motores da doença. Estes incluem a rasaglina e a selegilina.

Fonte: adaptado de Muzerengi e Clarke (2015).

Segundo Ríos *et al.* (2016) as alternativas terapêuticas para a prevenção ou tratamento da DP que podem ser consideradas são: (1) Compostos com propriedades antioxidantes com efeitos específicos no tecido neuronal; (2) Estudos sobre agentes anti-inflamatórios com efeitos no cérebro; (3) Existem compostos com efeitos específicos no sistema dopaminérgico, quer

com propriedades agonistas quer com aqueles que reduzem ou evitam o metabolismo da dopamina; (4) Compostos com antagonismo nos receptores muscarínicos ou ionotrópicos do glutamato no SNC; (5) Compostos que antagonizam receptores de adenosina, atualmente a relação entre o sistema de adenosina e a DP é conhecida. Autores ainda citam além dos tratamentos padrões, outras perspectivas e medidas que visam reduzir a progressão da doença, como o uso de agentes para a neuroproteção (NESTLER *et al.*, 2009; GOLDMAN e WEINTRAUB, 2015).

Uma revisão realizada por Li e colaboradores (2013) em que compilaram os principais medicamentos fitoterápicos utilizados para tratar a DP com base na medicina tradicional chinesa ou teorias farmacológicas modernas. Um total de 38 medicamentos e 11 formulações, ambas à base de plantas, foram testados em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Os pesquisadores focalizaram seu interesse nas espécies Ginseng siberiano, Chá da Índia, Ginkgo Biloba, Erva-de-São-João entre outras. O Ginseng siberiano, o extrato etanólico a 80% produziu efeitos protetores sobre neurônios dopaminérgicos em um modelo de camundongos com a DP induzida por MPTP (LIU *et al.*, 2012) O Ginseng siberiano também contém a Sesamina que possui um efeito preventivo na disfunção comportamental em modelos de ratos com a DP induzida por rotenona (FUJIKAWA *et al.*, 2005). A Sesamina modula a Tirosina Hidroxilase (TH), SOD, CAT, indutível sintase de ON e a expressão da Interleucina-6 em células dopaminérgicas sob estresse oxidativo induzido por MPP+ (LAHAIE-COLLINS *et al.*, 2008). O chá verde, é o produto derivado das folhas do Chá da Índia. E as catequinas polifenólicas derivadas do chá verde reduzem a morte celular em células dopaminérgicas SHSY-5Y (TAI & TRUONG, 2010). O extrato de Ginkgo Biloba, possuiu um efeito inibitório contra o estresse oxidativo, atua também na regulação da homeostase e na diminuição da neurodegeneração induzida por MPTP na via nigrostriatal em um modelo de camundongo com a DP (ROJAS *et al.*, 2008; ROJAS *et al.*, 2009). E a Erva-de-São-João, reduziu o estresse oxidativo e aumentou a expressão gênica de enzimas antioxidantes em ratos expostos a rotenona (SANCHEZ-REUS *et al.*, 2007).

Em diferentes medicamentos tradicionais de países asiáticos como Índia, China, Japão e Coréia, várias plantas medicinais têm sido usadas para tratar a DP. Seu uso é construído sobre as teorias baseadas na experiência em seus antigos sistemas médicos. Para demonstrar a eficácia destas plantas medicinais, Song *et al.* (2012) analisaram as atividades antiparkinsonianas de preparações à base de plantas em modelos neurotóxicos *in vitro* e *in vivo* da DP. Cinquenta e um medicamentos à base de plantas foram analisados, mas também incluíram, neste estudo, várias biomoléculas presentes nas plantas. Os resultados não foram relevantes para as plantas e

seus extratos, mas vários grupos químicos foram marcados como um grupo potencial de compostos ativos para estudos futuros, como estilbenóides, flavonóides, catequinas e terpenos e compostos isolados como baicaleína, puerarina, resveratrol, curcumina e ginsenosídeos, os quais poderiam ser candidatos a ensaios clínicos. Obtiveram resultados semelhantes e citaram alguns compostos ativos potenciais: terpenos (tenuigenina, ginsenosídeos e astragalósido IV), cumarinas (umbeliferona e esculetina), derivados de fenol (resveratrol, curcumina, ácido protocatequídico, equinacósido e ateósido) e flavonas (puerarin, luteolina, baicaleína e morina) (MORE *et al.*, 2013). No caso dos flavonóides, foi estabelecido que o consumo regular destes compostos estava associado a um risco reduzido de doenças neurodegenerativas.

Segundo Roshan *et al.* (2016) a cafeína pode reduzir os sintomas motores encontrados comumente no parkinsonismo, além de proteger os neurônios (KOLAHDOUZAN & HAMADEH, 2017), melhorar a cognição e o desempenho físico (CAPPELLETTI *et al.*, 2015). Um estudo desenvolvido, durante 30 anos, com 8004 homens (com idade entre 45-68 anos) consumidores de cafeína a partir do café e outras fontes mostrou uma incidência da DP de 1,9 por 10 000 (homens que tomaram cafeína) versus 10,4 por 10 000 (homens que não bebiam cafeína). Concluiu-se que uma maior ingestão de cafeína em si implica uma redução significativa na incidência da DP (SCHAPIRA *et al.*, 2014). A cafeína está contida no café, chás, bebidas energéticas, refrigerantes e no cacau (ULLRICH *et al.*, 2015; PONG *et al.*, 2015). Após o seu consumo, a cafeína é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e a maior concentração de cafeína no sangue é atingida 30-60 minutos após a sua ingestão (ULLRICH *et al.*, 2015).

## 2.6. A ERVA MATE

Segundo Bixby *et al.* (2005) a erva-mate é uma das bebidas com o maior teor de polifenóis e propriedades antioxidantes comprovadas. Seu uso, se difundiu depois que os jesuítas colonizadores decidiram promover o cultivo de mate como uma indústria. A bebida foi adotada mais tarde pelos brancos que o nomearam "chimarrão" no Brasil, "mate" na Argentina, no Uruguai e Paraguai como "tereré" onde é preparada com água fria no verão (BRACESCO *et al.*, 2011). O chimarrão e tererê são preparados a partir das folhas verdes da erva-mate secas, torradas e trituradas. Já o chá de mate é produzido com folhas torradas e preparado como os demais chás (GATTO *et al.*, 2015). Morfologicamente, são conhecidas duas variedades de erva-mate a *I. paraguariensis*: *I. paraguariensis* St.Hil. *Var paraguariensis* e *Ilex paraguariensis*

*var. Vestita (Reissek) Loes.* Ambas espécies existem no Brasil e Argentina, porém a mais usada é a *Ilex paraguariensis St. Hil* (FILIP *et al.*, 2010a).

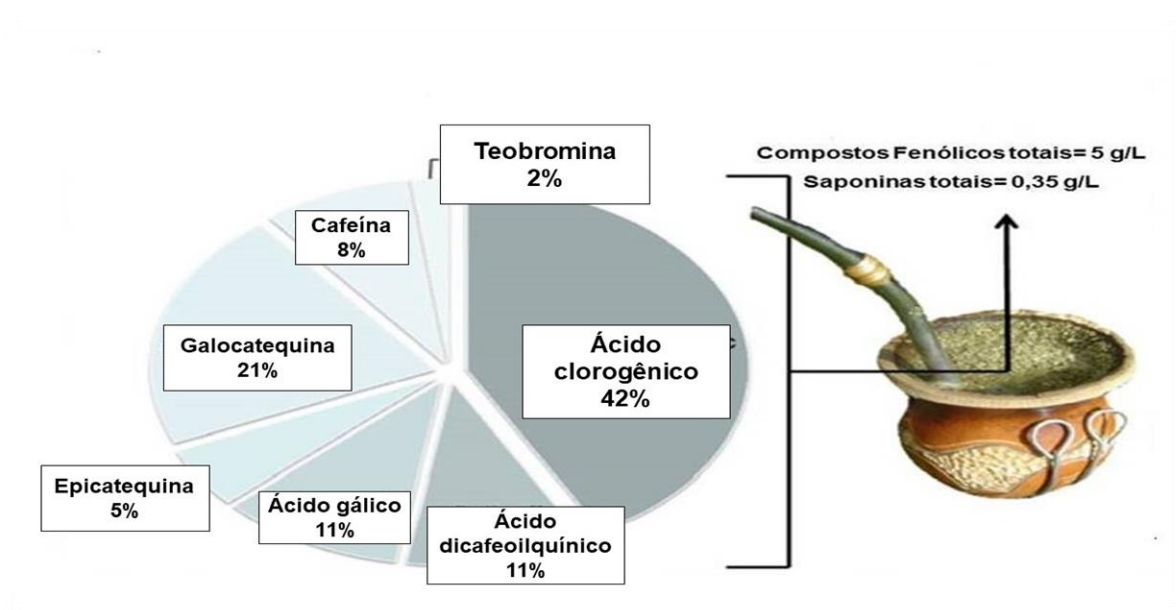
Entre os anos de 2009-2011, o Rio Grande do Sul produziu 263.928 toneladas/ano, tornando-se o maior produtor de erva-mate do País, tendo como maiores produtores os municípios de Arvorezinha, Ilópolis, Palmeira das Missões, Fontoura Xavier e Venâncio Aires. O Paraná vem em segundo lugar com uma produção anual de 126.778 toneladas de folhas, seguido por Santa Catarina (45.045 toneladas/ano) e Mato Grosso do Sul (3.272 toneladas/ano) (EMBRAPA, 2010).

Quanto a sua utilização, o chimarrão é fonte de cafeína, em substituição ao chá e o café, mas também como agente terapêutico farmacológico. Aproximadamente de 20-40 mL de chimarrão é bebido a cada tempo, e muitos consumidores bebem 1-2 litros por dia, sendo que o processo de beber é contínuo e geralmente acompanha as atividades diárias. No Sudeste do Brasil, São Paulo e Rio de Janeiro, as folhas de erva-mate são torradas de uma forma que lembra o utilizado para o “chá mate” transformado em bebidas açucaradas (BRACESCO *et al.*, 2011).

Os principais componentes bioativos do extrato de erva-mate são: os extratos verdes (não torrados) que contêm purina, Alcalóides (metilxantinas), flavonóides, vitamina A, complexo B, C e E, taninos, ácido clorogênico e seus derivados, e as matesaponinas (BASTOS *et al.*, 2007; HECK e DE MEJIA, 2007; MENINI *et al.*, 2007; MARTINET *et al.*, 2001).

Da erva-mate se extrai níveis de polifenóis mais altos do que o chá verde, e semelhante ao vinho tinto (Gugliucci *et al.*, 2009a, b). Conforme demonstrado abaixo na Figura 5, os extratos de erva-mate são especialmente ricos em ácidos clorogênicos (BASTOS *et al.*, 2007, HECK e DE MEJIA, 2007; MENINI *et al.*, 2007; DE MORAIS *et al.*, 2009; FILIP *et al.*, 2010a). Que são também importantes compostos fenólicos presentes no café, morangos, abacaxis, maçãs, girassol e mirtilos. O ácido clorogênico, comercialmente disponível, tem sido estudado devido à sua atividade antioxidante (CLIFFORD, 1999, 2004; OLTHOF *et al.*, 2001; JAISWAL *et al.*, 2010). A erva-mate, também contém saponinas, que são conhecidos pela ligação com os sais biliares (BASTOS *et al.*, 2007, GNOATTO, 2008). Os extratos torrados de erva-mate (consumidos em São Paulo e Rio de Janeiro) mantêm essencialmente os mesmos componentes, com a adição de melanoidinas, que têm algumas propriedades bioativas (BASTOS *et al.*, 2007).

Figura 5 – Principais componentes orgânicos dos extratos de erva-mate.



Fonte: Adaptado de Bracesco e colaboradores (2011).

Juntamente com o uso tradicional e contínuo de bebidas de erva-mate, foi utilizada também para a fabricação de cervejas, cremes, doces e outros usos não tradicionais na última década (VIEIRA *et al.*, 2008). Acabou atingindo os supermercados sob a forma de bebidas energéticas, na Europa é comercializado associado a outras ervas sob a forma de chá energético ou como um auxílio na redução de peso (BRACESCO *et al.*, 2011).

A Argentina é o principal exportador de erva-mate e tem o consumo de 5 kg/pessoa/ano, enquanto o Uruguai tem o maior consumo per capita: 6-8 kg/pessoa/ano (BRACESCO *et al.*, 2011).

## 2.7.EFEITOS BIOLÓGICOS DA ERVA-MATE

Estudos descrevem uma forte proteção contra a Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL), colesterol ruim, em humanos, e o aumento na atividade da enzima paraoxonase 1 (PON1) na Lipoproteína de Alta Densidade (HDL), colesterol bom (GUGLIUCCI, 1996, GUGLIUCCI e MENINI, 2002). A PON1 é uma enzima antioxidante presente no HDL que tem um efeito protetor na formação da placa de ateroma. O primeiro estudo translacional, em humanos, demonstrou que o consumo de erva-mate melhora os parâmetros lipídicos séricos em

indivíduos saudáveis e dislipidêmicos. O LDL foi significativamente reduzido, em paralelo, a um aumento no HDL em uma coorte de indivíduos dislipidêmicos que não realizavam tratamento e que bebiam mate a pelo menos dois meses em comparação com o grupo controle (DE MORAIS et al., 2009).

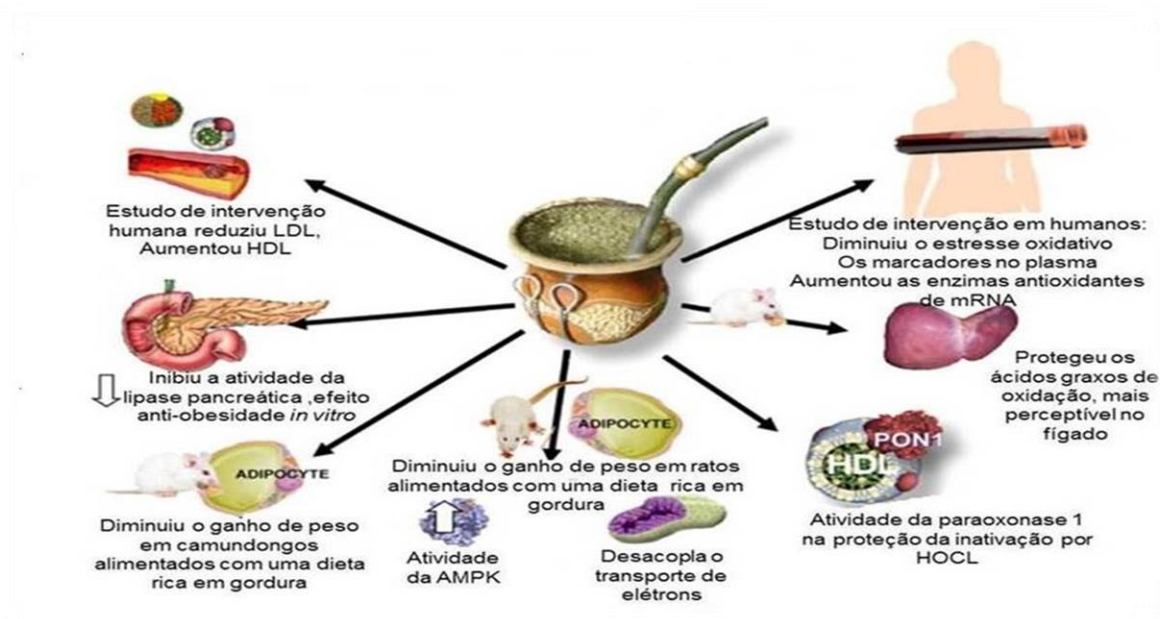
A PON1, combate a oxidação do LDL e reduz a oxidação de macrófagos. Dessa forma, a PON1, tem um efeito protetor na formação da placa de ateroma e sua atividade pode ser significativamente reduzida pela oxidação do HDL pelo Ácido Hipoclorídrico (HClO). O HClO é liberado por neutrófilos e macrófagos que são abundantes em lesões inflamatórias. Um estudo constatou, que o ácido clorogênico é o principal fenólico na erva-mate, protegendo a enzima antioxidante do colesterol a partir da inatividade causada por alterações fisiológicas nas concentrações de hipoclorito (GUGLIUCCI et al., 2009a, b).

A obesidade é outro fator de risco metabólico e aterogênico chave. Um dos supostos efeitos dos extratos de erva-mate seria a redução de peso (ANDERSEN e FOGH, 2001; PITTLER et al., 2005; DICKEL, 2007). Um dos possíveis mecanismos seria a inibição da lipase pancreática na diminuição da absorção lipídica e, portanto, favorecendo a redução de peso (SUGIMOTO et al., 2009; MARTINS et al., 2010). Além disso, alguns estudos demonstraram que ratos alimentados com extratos de erva-mate e dietas ricas em lipídios ganham menos peso do que o grupo controle. Os dados mostram que extrato de erva-mate tem potente atividade anti-obesidade *in vivo* em ratos obesos (ARCARI *et al.*, 2009). A enzima 5' Adenosina Monofosfato tivo Proteína Kinase (AMPK) está relacionada como um sensor no metabolismo da síndrome: obesidade e diabetes. De maneira que os extratos de erva-mate possuem uma forte atividade na ativação de AMPK. E o consumo de extratos de erva-mate diminuiu a oxidação de ácidos graxos insaturados no fígado de ratos (MARTINS *et al.*, 2009).

Em um estudo de intervenção em humanos, os autores avaliaram os efeitos da suplementação dietética de erva-mate sobre a suscetibilidade do plasma à oxidação e a expressão do gene das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPX). Após um período de suplementação com chá de erva-mate, a peroxidação foi agudamente reduzida, esse efeito foi mantido após a administração prolongada (MATSUMOTO *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que o consumo regular da erva-mate pode melhorar as defesas antioxidantes por múltiplos mecanismos, não só aumentando os compostos ativos circulantes, mas pela regulação positiva enzimática celular para o estresse oxidativo. A Figura 6 resume os resultados mais relevantes supracitados.



Figura 6 – Evidência que aprova os efeitos benéficos de erva-mate em distúrbios lipídicos, obesidade e estresse oxidativo.



Fonte: adaptado de Bracesco e colaboradores (2011).

## 2.8.EFEITOS DOS EXTRATOS DE ERVA-MATE NA INFLAMAÇÃO

Os efeitos anti-inflamatórios e imuno-moduladores da erva-mate têm sido objeto de muitos estudos (ZUIN *et al.*, 2005, SCHUBERT *et al.*, 2007). Eles descrevem efeitos antioxidantes ou efeitos mediados por vias de sinalização celular como fator nuclear kappa B (NF-k) e outros. O estudo com macrófagos humanos ativados por LPS na presença de extratos brutos de erva-mate ou com componentes individuais demonstraram que a quercetina foi o inibidor mais potente da inflamação como medidas pelo bloqueio de COX-2 (PUANGPRAPHANT e DE MEJIA, 2009). A combinação de saponinas de quercetina na erva-mate resultou em interação sinérgica inibindo tanto o ON e Prostaglandina 2 (PGE2). Ele também suprimiu a produção de Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-1 (IL-1  $\beta$ ) e resultou na redução da translocação nuclear induzida por LPS. O extrato bruto, não tem um efeito potente anti-inflamatório possivelmente devido o efeito antagonista de alguns de seus compostos (BRACESCO *et al.*, 2011).

Em um estudo, ratos foram pré-tratados com erva-mate e, logo após, foi extraído partes do pulmão exposto a fumaça do cigarro. Foi observado que a erva-mate reduziu a inflamação

pulmonar aguda (LANZETTI *et al.*, 2008). Esses dados demonstram, o papel antioxidante da erva-mate como um recurso anti-inflamatório no pulmão lesionado (LANZETTI *et al.*, 2008).

Os extratos de erva-mate também exercem uma atividade antifúngica. O fungo (*Malassezia furfur*) produz lesões cutâneas em seres humanos e a atividade antifúngica da erva-mate foi semelhante a pomadas utilizadas para tratar os distúrbios cutâneos. O uso tópico, do extrato de erva-mate, pode ser então um agente antifúngico utilizado para esta infecção. Os triterpenóides da erva-mate exibem atividades inibitórias contra *Trypanosoma cruzi* (TAKETA *et al.*, 2004).

Os tratamentos realizados com extrato aquoso de erva-mate e cafeína nas membranas vasculares de embriões revelaram propriedades pró-vasculares e angiogênicas, assim como, o crescimento embrionário (STRASSMANN *et al.*, 2008).

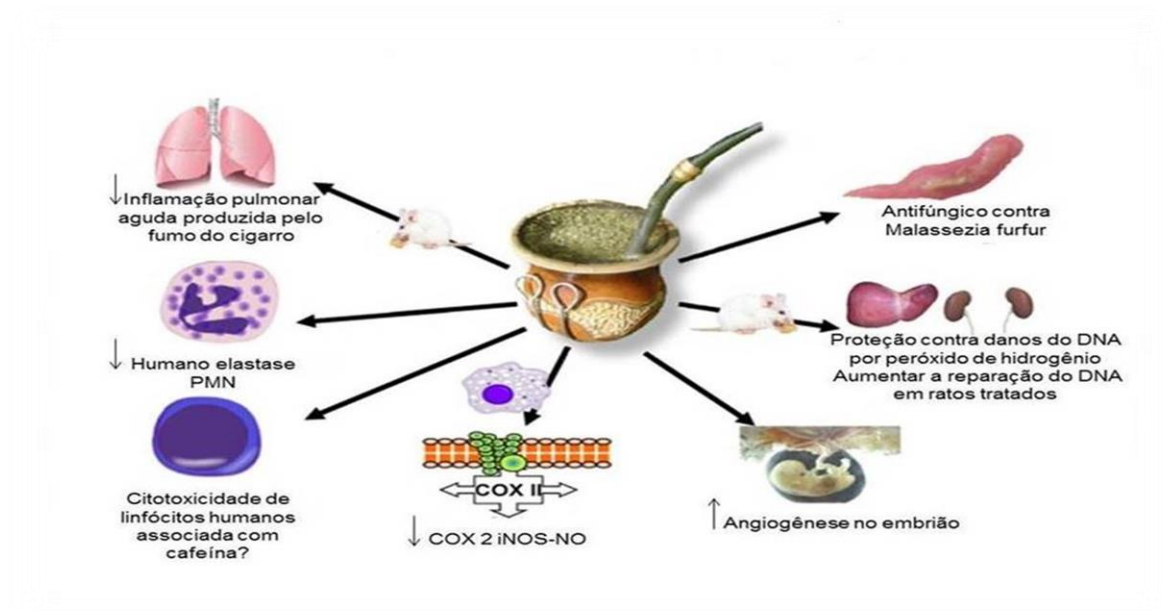
Alguns estudos epidemiológicos indicam que existe uma associação entre o consumo de erva-mate e câncer orofaríngeo (VASSALLO *et al.*, 1985, DE STEFANI *et al.*, 1988, PINTOS *et al.*, 1994; SEWRAM *et al.*, 2003; LORIA *et al.*, 2009). O efeito parece estar relacionado à temperatura da infusão e não à própria bebida (RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004), e outros fatores podem ter influenciado tais resultados como o tabagismo, desnutrição e consumo concomitante com álcool. Ao mesmo tempo, níveis elevados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos carcinogênicos foram encontrados em bebidas de erva-mate e isso pode ser motivo de preocupação (LEITÃO e BRAGA, 1994, KAMANGAR *et al.*, 2008). Eles são produzidos durante o processo de fabricação das folhas (secagem) utilizando lenha (HSU *et al.*, 1995, JACQUES *et al.*, 2007, HECK *et al.*, 2008). Portanto, as práticas de produção podem ser um potencial perigo (TENORIO SANZ e TORIJA ISASA, 1991, VERA GARCIA *et al.*, 1997; WROBEL e URBINA, 2000). A questão permanece aberta, uma vez que não existe um estudo de caso-controle, com base populacional, sobre o consumo de erva-mate e o fator de risco para o câncer (DE STEFANI *et al.*, 1991).

Por outro lado, muitos estudos em modelos de cultura celular, bem como, em animais parecem convergir para mostrar um agente antimutagênico e o efeito protetor para extratos de erva-mate e seus componentes: ácido clorogênico, rutina, quercetina (BRACESCO *et al.*, 2003; MIRANDA *et al.*, 2008).

A ingestão regular de chimarrão aumentou a resistência a rupturas nas cadeias de DNA induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e melhorou o reparo no DNA após a utilização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células hepáticas. Esses resultados sugerem que o chimarrão pode proteger contra danos no DNA e ativar a maquinaria de reparo do DNA (BRACESCO *et al.*, 2011). A proteção pode ser atribuída aos compostos antioxidantes e na atividade dos compostos bioativos: ácido clorogênico, rutina,

quercetina (BRACESCO *et al.*, 2003, MIRANDA *et al.*, 2008). Os principais resultados da erva-mate na inflamação e mutagênese são demonstrados na Figura 7.

Figura 7 – Evidência que apoia os efeitos benéficos de erva-mate na inflamação e mutagênese



Fonte: adaptado de Bracesco e colaboradores (2011).

## 2.9. LINHAGEM DE MACRÓFAGOS (RAW 264.7) COMO MODELO *IN VITRO* DE INFLAMAÇÃO NO ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON

Os macrófagos desempenham papel fundamental na regulação de processos inflamatórios agudos e crônicos através da secreção de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (FULLERTON e GILROY, 2016). Essas células apresentadoras de antígeno, potencializam a ativação de Linfócito T e B pela expressão de moléculas co-estimuladoras e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ . Os macrófagos sintetizam ainda EROs ( $O_2^-$ , OH,  $H_2O_2$ ) e intermediários reativos do nitrogênio, cujo principal representante é o ON. (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Por ser extensivamente secretada e permanecer em níveis significativos como pró-IL-1 $\beta$  no citoplasma, esta molécula é considerada a principal citocina pró-inflamatória produzida por células como os macrófagos. Níveis baixos de IL-1 $\beta$  induzem resposta inflamatória limitada. Contudo níveis elevados de IL-1 $\beta$  induzem resposta inflamatória generalizada, dano tecidual e supressão imune (VORONOV *et al.*, 2014).

A utilização linhagens celulares comerciais para estudos iniciais a cerca de propriedades de plantas é bastante apropriada uma que os resultados podem ser reproduzidos por outros grupos de pesquisa, exclui-se a potencial interferência de moléculas produzidas por outras células do sistema imune, e dispensa a utilização de animais. A linhagem de macrófagos RAW 264.7, tem sido cada vez mais utilizada para a análise de potencial atividade pró-inflamatória ou anti-inflamatórias de fármacos, plantas ou outros agentes químicos.

Tal linhagem é constituída por células que possuem propriedades de macrófagos normais, artificialmente obtida a partir da infecção com o vírus Albelson de ratos Balb-C por Raschke e colaboradores (1978). A linhagem RAW 264.7 é comercializada pela ATCC (American Type Culture Collection), uma organização não governamental sem fins lucrativos (ATCC® TIB-71™).

Os macrófagos RAW podem ser ativados por antígenos como a Fitohemaglutinina (PHA), LPS, e Zimosan, e tal ativação leva a produção de mediadores pró-inflamatórios como o ON, prostaglandinas E2 e citocinas como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ .

Para se observar a atividade anti-inflamatória de um determinado composto, os macrófagos RAW são tratados com algum dos antígenos já citados e mantem-se este tratamento em contato com a célula por no mínimo 18 horas para que ocorra a ativação inflamatória, em seguida é realizado o tratamento com o composto teste com potencial anti-inflamatório, e após 72 horas (em geral), se o composto teste apresentar ação anti-inflamatória de reversão há uma diminuição dos marcadores inflamatórios em relação às células tratadas apenas com o antígeno (KARABAY *et al.*, 2015). Por outro lado, a ativação destas células por determinados por fármacos, ou compostos pode indicar atividade pró-inflamatória dos mesmos. Por este motivo, geralmente esta linhagem celular é utilizada para avaliar efeitos na inflamação causados por fármacos e extratos de plantas (DEL-ÁNGEL *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2016).

Um recente estudo avaliou o efeito neuroprotetor do glucosinolato de glucomorinina (GMG) [4- ( $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi) benzilo] com a enzima mirosinase para formar o correspondente isotiocianato [4- ( $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi) benzilo C; Moringina] no tratamento ou prevenção da DP. Nesse estudo, os autores investigaram que um pré-tratamento com *Moringa Oleifera* poderia modular o desencadeamento da cascata inflamatória com uma resposta correlacionada, testaram sua atividade anti-inflamatória *in vitro* usando um modelo de RAW 264,7 (macrófagos) estimulados com lipopolissacarídeo. Os resultados mostraram que houve uma maior efetividade da *Moringa Oleifera* em combater, principalmente, a via inflamatória foi corroborada pelas análises obtidas *in vitro*. Concluíram que a relevância e

inovação do estudo residem na possível utilização de uma formulação segura de um composto bioativo (GIACOPPO *et al.*, 2017).

Na DP a neuroinflamação é considerada comum, assim como, a presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatória e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Um estudo celular com macrófagos de rato *in vitro* (RAW 264.7), foi desenvolvido para identificar novos agentes de redução do TNF-  $\alpha$  que incorporam as características físico-químicas lipofílicas preditas para permitir a penetração na barreira hemato-encefálica. Como resultado as células cultivadas RAW 264.7 expostas LPS induziram uma libertação celular rápida, marcada e dependente da concentração de TNF-  $\alpha$  no meio da cultura celular, que foi prontamente detectado por Ensaio de Imuno Sorbent Ligado a Enzima (ELISA). Assim como, a atividade determinada no modelo celular traduziu-se num modelo de roedor *in vivo de* elevação aguda de TNF- $\alpha$  induzida por LPS (TWEEDIE *et al.*, 2009)

Uma grande vantagem da utilização de um modelo de linha celular (RAW 264.7), é a natureza altamente reprodutível da resposta biológica das células a ativadores de células imunitárias, tais como PHA. A utilidade de um modelo de células RAW 264.7 reprodutível *in vitro* permite uma maior consistência no estudo do papel tanto da inflamação como dos agentes anti-inflamatórios em modelos de doença e, talvez, uma renovação mais rápida de novas ferramentas ou medicamentos farmacológicos anti-inflamatórios (TWEEDIE *et al.*, 2009)

## 2.10. A LINHAGEM NEURONAL SH-5YSY COMO MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* NO ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON

Uma vez que a DP é complexa e idade-dependente, o estudo de novos compostos ou fármacos que regenerem ou previnam a evolução da doença precisam ser inicialmente conduzidos em modelos experimentais. O modelo experimental mais simples, que não envolve questões éticas é o modelo celular *in vitro*. Este modelo está sendo cada vez mais utilizado na farmacologia gerontológica.

Para a DP, existem modelos *in vitro* bem estabelecidos como é o caso da linhagem de neuroblastoma que apresenta funções similares a neurônios dopaminérgicos, denominada células SH-SY5Y. Estas células são derivadas de uma biopsia, realizada no ano de 1973, proveniente de uma criança com quatro anos de idade que havia sido diagnosticada com neuroblastoma. No caso, a biopsia foi conduzida na medula óssea vermelha onde já havia uma metástase do tumor (JALEWA, SHARMA e HÖLSCHER 2016).

O sub-clone SH-SY5Y descrito em 1978 é geneticamente feminino, pois tem dois cromossomos X. Entretanto, esta linhagem possui um cromossomo X anormal apresentando um braço curto adicional do cromossomo (1q) o que indica que as células SH-SY5Y são trissômicas. Como estas células podem ser estimuladas a se diferenciarem *in vitro* elas apresentam concentrações moderadas de dopamina e podem ser induzidas quimicamente a terem características semelhantes a neurônios dopaminérgicos. Atualmente a linhagem celular é comercializada pela ATCC (*American Type Culture Collection*) que é uma organização não governamental americana, sem fins lucrativos, que possui uma vasta coleção de linhagens de células saudáveis e de câncer que podem ser adquiridas e utilizadas em estudos científicos *in vitro*. Por se tratar de linhagens celulares não existe a necessidade de aprovação do estudo por Comitês de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (JALEWA, SHARMA e HÖLSCHER 2016).

Em cultura, estas células são cultivadas com um meio de cultura específico denominado *Dulbecco's Modified Eagle Medium* F12(DMEM/F12) que é suplementado com 10% de SFB e 1% de antifúngico. Estas células se aderem no fundo do frasco de cultura formando uma única camada de células. Geralmente as células SH-SY5Y crescem de duas maneiras distintas. Algumas células crescem em aglomerados que ficam flutuando no meio enquanto outras se fixam no fundo do frasco de cultura. No caso, as células com características similares a neurônios são aquelas que ficam fixas (JALEWA, SHARMA e HÖLSCHER 2016).

Evidências emergentes têm sugerido que a associação entre disfunção mitocondrial, a disfunção da enzima  $\alpha$ -sinucleína que forma fibrilas e o estresse oxidativo contribuem para causar inflamação crônica no tecido neurológico, formação dos corpos de Lewys e agravamento dos sintomas da DP. Como a rotenona induz a estas alterações ela é utilizada no modelo *in vitro* de Parkinson com células SH-SY5Y (SILVA *et al.*, 2013).

A rotenona é uma molécula química inodora que é utilizada na fabricação de inseticidas e pesticidas. Na natureza, a rotenona ocorre nas raízes e caules de algumas espécies de plantas. Quando injetada em ratos causa os mesmos sintomas da DP (JALEWA, SHARMA e HÖLSCHER 2016). A rotenona consegue atravessar rapidamente a barreira cérebro-espinhal de modelos experimentais animais e também a membrana de linhagens celulares como a SH-SY5Y. Uma vez que a rotenona entra no neurônio ela causa disfunção mitocondrial, especificamente no 17 complexo mitocondrial I, que leva a diminuição da produção de energia para a sobrevivência e função celular (ATP) e o aumento dos níveis do  $O_2^-$  (JALEWA, SHARMA e HÖLSCHER 2016).

A maior concentração de  $O_2^-$  facilmente produz outras EROs como o  $H_2O_2$  e  $OH^-$ . Estas moléculas conseguem reagir facilmente com lipídios, proteínas e DNA causando um estado conhecido como “estresse oxidativo”. Como a rotenona está associada a estas alterações esta molécula também induz a formação de fibrilas causadas pela disfunção da proteína  $\alpha$ -sinucleína e corpos de Lewys (SILVA *et al.*, 2013). O acúmulo de fibrilas causado pela aglomeração de proteínas  $\alpha$ -sinucleínas alteradas, que dá origem aos corpos de Lewys pode ser visualmente observado em nível de microscopia ótica através da coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E). Isto ocorre porque as fibrilas são eosinófilas e coram-se intensamente de rosa. As culturas de 21 dias de células a SH-SY5Y expostas a 50  $\mu$ M de rotenona já possibilitam a visualização dos corpos de Lewys (SILVA *et al.*, 2013; JALEWA, SHARMA e HÖLSCHER 2016).

Com base nestas considerações acredita-se que o modelo *in vitro* de Parkinson SH-SY5Y/rotenona possa ser utilizado para investigar o potencial efeito neuroprotetor da erva-mate.





### **3. MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1.DELINEAMENTO DO ESTUDO**

O projeto realizou três estudos complementares, de caráter experimental *in vitro*. O primeiro avaliou o efeito genotóxico do extrato aquoso de erva-mate em células neuronais (SH-SY5Y) e em macrófagos (RAW 264.7); o segundo avaliou o extrato aquoso de erva-mate na inflamação utilizando a linhagem de células RAW 264.7; e o terceiro analisou o efeito neuroprotetor do extrato aquoso de erva-mate nos sintomas parkinsonianos através de um modelo *in vitro* (células SH-SY5Y), tratadas com rotenona.

#### **3.2.LOCAL DA PESQUISA**

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Prédio 19, do Campus da Universidade Federal de Santa Maria.

#### **3.3.PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

##### **3.3.1. Obtenção do extrato aquoso de Erva Mate (*Ilex paraguariensis*)**

O extrato de Erva Mate (*Ilex paraguariensis*) foi obtido através da infusão de 100 g de pó, amostra seca, em 1000 mL de água destilada e deionizada por 10 minutos de perfusão com uma temperatura de aproximadamente 90°C e, 3 agitação suave (por vezes: 0, 5 e 10 '). Após extração, a solução resultante foi filtrada através de um papel filtro nº 8, colocado em vidro âmbar (capacidade de 1,5 L), o recipiente foi protegido da luz, armazenado a -8°C, e a seguir foi liofilizado. O extrato produzido foi equivalente ao chá instantâneo e foi mantido a -20°C em tubos de plástico, selados com parafilme e protegido da luz até à utilização nos experimentos. Também foi realizada a análise da composição química da infusão através da cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC).

##### **3.3.2. Tratamento e cultivo *in vitro* das células SH-SY5Y**

As células SH-SY5Y, obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM F12),

suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 1% de antifúngico (anfotericina B), essas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> com 5% de saturação à 37 C°. As células foram cultivadas até a aquisição da confluência e número de células necessárias para o desenvolvimento dos tratamentos e ensaios propostos.

No primeiro estudo as células foram tratadas com extrato aquoso de erva mate, nas concentrações 1, 5, 10, 20,100 µg/mL, visando avaliar o efeito de cada concentração, para escolha da melhor concentração a ser utilizada nos testes. Para análise, as células foram pré-tratadas com erva-mate e em seguida expostas a rotenona. Após foram realizadas as seguintes análises: proliferação celular através do teste do ciclo celular, indução da apoptose pela análise da via das caspases, níveis dos marcadores oxidativos (lipoperoxidação através do teste TBARs, Carbonilação de proteínas, níveis de EROs via DCFH-DA e superóxido via teste com NBT), analisou-se ainda os níveis das enzimas antioxidantes via expressão gênica e atividade enzimática.

### **3.3.3. Tratamento e cultivo *in vitro* das células RAW 264.7**

As células RAW 264.7, obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*) foram cultivadas em meio Dulbecco's DMEM, suplementado com 10% de SFB, e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 1% de antifúngico (anfotericina B), essas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> com 5% de saturação à 37 C°. As células foram cultivadas até a aquisição da confluência e número de células necessárias para o desenvolvimento dos tratamentos e ensaios propostos.

Nesse estudo as células foram tratadas com extrato aquoso de erva mate, nas concentrações 1, 5, 10, 20,100 µg/mL, visando avaliar o efeito de cada concentração, para escolha da melhor concentração a ser utilizada nos testes. Para análise, as células foram pré-tratadas com Fitohemaglutinina, um agente pró-inflamatório, e após 24 horas, as células foram tratadas com erva-mate, permanecendo em contato por 72 horas, após esse período foram analisados os marcadores inflamatórios: Expressão gênica e protéica das interleucina 1, 6, e da citocina anti-inflamatória IL-10, proliferação celular através do teste do ciclo celular, níveis dos marcadores oxidativos ( lipoperoxidação através do testes TBARs, carbonilação de proteínas , níveis de EROs, via DCFH-DA e superóxido via teste com NBT), analisou-se ainda os níveis das enzimas antioxidantes via expressão gênica e atividade enzimática.

### 3.3.4. Avaliação do efeito no ciclo celular por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular foi realizada para avaliar em que fase do ciclo as células se encontravam. Para tanto as células foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço, e após, foram tratadas somente com erva-mate, em seguida, expostas a rotenona e posteriormente tratadas com erva-mate e incubada por 72 horas. Posteriormente as células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com PBS (tampão fosfato) gelado. Terminado este procedimento, as células foram ressuspensas e fixadas em etanol gelado 70%, durante 15 minutos, e armazenadas a  $-4^\circ\text{C}$  até serem analisadas. No momento da análise, o etanol foi aspirado e os precipitados celulares foram lavados duas vezes com PBS gelado. As células foram incubadas em solução de Iodeto de Propídio (IP), RNase e Triton durante 40 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após este procedimento, as células foram ressuspensas em PBS sendo feita a leitura das mesmas por citometria de fluxo. O ciclo celular é determinado pela quantidade de DNA marcada através da coloração de IP a 575/26 nm, e 610/20nm 670/14nm canais no BD LSRII e o canal 575/26nm no BD FACSCanto II (AZZOLIN *et al.*, 2016).

Assim, após a análise destas células no citômetro de fluxo, pode-se definir as células na fase G0/G1, S e G2/M de acordo com a intensidade de fluorescência, relativa ao aumento do conteúdo de DNA intracelular. Ainda, as células com uma menor intensidade de fluorescência são as células que apresentam uma fragmentação do DNA, ou seja, apoptose celular.

### 3.3.5. Ensaio MTT

Foi utilizado para analisar viabilidade e proliferação celular, sendo considerado um teste de viabilidade quando as células permanecem em contato com o tratamento por 24 horas, e de proliferação quando a incubação com o tratamento for de 72 horas. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um teste espectrofotométrico em que as células tratadas são incubadas durante 1 hora com o reagente MTT a  $37^\circ\text{C}$ . Resumidamente, o sal de tetrazólio, hidrossolúvel, de coloração amarelada, é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em cristais de formazan, insolúveis em água e de coloração roxo-azulada, que ficam armazenados no citoplasma celular, sendo posteriormente solubilizados, pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, é realizada a quantificação colorimétrica em um leitor e a absorbância medida a 570 nm. A metodologia utilizada está baseada em Costa *et al.* (2012).

### 3.3.6. Análise da apoptose celular por via das caspases

Foi avaliado as caspases 1, 3 e 8 através do teste imunoenzimático ELISA após 72 horas de tratamento, utilizando-se o *kit Quantikine*<sup>®</sup>, conforme recomendações do fabricante. Inicialmente, foi adicionado 50 µL do diluente RD1W a cada poço da placa. Em seguida, os padrões dos testes e as amostras em análise foram adicionados nos respectivos poços, sendo a placa selada e incubada durante 1,5h a temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados duas vezes com solução de lavagem. O anticorpo primário foi então adicionado e incubado por 30 min a temperatura ambiente. Logo em seguida, a placa foi lavada novamente e adicionou-se 100 µL de solução substrato da reação, com incubação de 20 min a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL da solução de paragem a cada poço e a densidade óptica foi determinada dentro de 30 min, utilizando um leitor de microplacas ajustado para 450 nm.

### 3.3.7. Parâmetros relacionados ao estresse oxidativo

#### 3.3.7.1. Atividade das Enzimas antioxidantes

Foi avaliado as enzimas SOD, CAT e GPX através do teste imunoenzimático ELISA após 72 horas de tratamento, utilizando-se o *kit Quantikine*<sup>®</sup>, conforme recomendações do fabricante. Inicialmente, foi adicionado 50 µL do diluente RD1W a cada poço da placa. Em seguida, os padrões dos testes e as amostras em análise foram adicionados nos respectivos poços, sendo a placa selada e incubada durante 1,5h a temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados duas vezes com solução de lavagem. O anticorpo primário foi então adicionado e incubado por 30 min a temperatura ambiente. Logo em seguida, a placa foi lavada novamente e adicionou-se 100 µL de solução substrato da reação, com incubação de 20 min a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL da solução de paragem a cada poço e a densidade óptica foi determinada dentro de 30 min, utilizando um leitor de microplacas ajustado para 450 nm.

#### 3.3.7.2. Teste da Diclorofluoresceínadiacetato (DCFH-DA)

A produção de EROs foi monitorada através o uso de uma sonda fluorescente, a 2,7'-diclorofluoresceína (DCF). Este ensaio está baseado no seguinte pressuposto químico: o

diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA) é capaz de difundir-se através de membranas celulares. Dentro das células esta molécula é deacetilada pela ação das enzimas esterases intracelulares. Esta reação forma, por sua vez, um produto não-fluorescente, a Dihidroclorofluoresceína (DCFH). A DCFH na presença de EROs é oxidada (preferencialmente peróxidos, hidroperóxidos e  $\text{NO}^\bullet$ ) passando para uma forma altamente fluorescente a diclorofluoresceína (DCF).

Assim, a oxidação do DCFH pelas células causa a fluorescência da diclorofluoresceína que pode ser detectada nos comprimentos de onda 525 nm de emissão e 488 nm de excitação (COSTA *et al.*, 2012).

Para o teste foi realizado utilizando uma placa escura de 96 poços, cada amostra foi testada em quaduplicata. Para cada teste foram pipetados 65  $\mu\text{l}$  de TrisHCl (10mM) pH 7,4 em seguida 50  $\mu\text{l}$  de plasma e por último 10  $\mu\text{l}$  de DCFH-DA (0,1mM), no teste controle (Branco) foram utilizados 115  $\mu\text{l}$  TrisHCl (10mM) pH 7,4 e 10  $\mu\text{l}$  de DCFH-DA. Incubar-se-á então por 1 hora no escuro e em seguida foi procedida a leitura em fluorímetro (Multi-mode M2/M2e SpectraMax Leitor Plate, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA).

### 3.3.7.3. Avaliação da Peroxidação Lipídica/ Ensaio TBARS

Considerando que o estresse oxidativo pode causar danos em nível de membrana celular, avaliou-se a peroxidação lipídica através da técnica espectrofotométrica do TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico), assim foi possível averiguar a presença de peroxidação lipídica, por meio da reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA), quanto maior a presença de MDA maiores os índices de lipoperoxidação.

Para realização dos testes, em todas as amostras, foram acrescidas de água, ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a 10%, ácido tricloroacético (TCA) a 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,2%. Para tal foi confeccionada uma curva de dosagem de MDA para posterior determinação da equivalência de cada amostra em teste.

Após a adição de todos os reagentes, foi procedido a incubação por 1 hora a  $95^\circ\text{C}$  e em seguida, com as amostras a temperatura ambiente, foi efetivada a leitura das absorbâncias a 532nm em espectrofotômetro. Os resultados são expressos como nmol de MDA/mL de células (Lykkesfeldt 2007; Catalgol *et al.*, 2007).

#### 3.3.7.4. Carbonilação de proteínas

Durante o estresse oxidativo em proteínas, ocorre a fragmentação das cadeias e a oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos com a produção frequente de compostos carbonilados (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Estes danos foram mensurados pela determinação de formação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilidrazina como previamente descrito por Morabito e colaboradores (2004). O conteúdo de formação de carbonil foi determinado através de leitura em fluorímetro (Multi-mode M2/M2e SpectraMax Leitor Plate, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) em placa de elisa UV no comprimento de onda 370nm usando um coeficiente 22.000 molar.

#### 3.3.7.5. Quantificação de superóxido

A metodologia utilizada está descrita em Morabito *et al.*, 2010. A saber, 10 µl do reagente nitro blue tetrazolium (NBT) foi adicionado a 100 µl de suspensão de celular. Permanecendo em incubação por 3 horas a 37 ° C. Em seguida, o sobrenadante foi removido, e adicionado 100 µl de DMSO, após 10 minutos de incubação, o sobrenadante foi removido e a absorbância medida a 560 nm

#### 3.3.7.6. Análise da expressão gênica via das enzimas antioxidantes via qRT-PCR

A análise da expressão gênica foi realizada 24 horas após a exposição das células aos tratamentos. O RNA total extraído utilizando Trizol, seguindo as instruções do fabricante (Ludwig-Biotec, Brasil). O RNA extraído foi mensurado espectrofotometricamente por um NanoDrop Thermo Scientific™ 1000. Para realizar a transcrição reversa, inicialmente foi adicionado às amostras de RNA (500 ng /µL) 0,2 µL de DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e incubada em termociclador á 37°C durante 5 minutos, seguido por aquecimento a 65°C durante 10 minutos. O cDNA gerado a partir da adição de 1µL de cDNA Iscript e 4 µL de mistura de Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-EUA) de acordo com as seguintes condições de reação em termociclador: 5°C durante 10 minutos, 25°C durante 5 minutos, 85°C durante 5 minutos e, finalmente, 5°C durante 60 minutos. O qRT-PCR foi realizado no rotor-Gene Q 5plex GRH Sistema (Qiagen biotecnologia, Alemanha), utilizando o reagente 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen biotecnologia, Alemanha),

1 µL de amostra, 1 µM de cada primer (iniciador), água livre de RNAses , perfazendo um total de 20 µL. A reação ocorreu sob as seguintes condições: 95 °C durante 3 minutos na sequência 40 ciclos de 95° C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos, seguido por uma curva de melting de 60°C a 90°C em passos de 0,5 °C durante 5 segundos. O gene da beta-actina foi utilizado como *housekeeping*, e o seu nível de expressão definido como o controle interno de referência. A expressão relativa foi calculada via sistema de normalização do próprio equipamento. A tabela 3 traz a sequência dos iniciadores utilizados para análise da expressão gênica.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados para análise da expressão gênica

Genes	Iniciadores	
	Sense	Antisense
<i>β-Actina</i>	5'- GTGGATCAGCAAGCAGGAGTA-3'	5'-TGC GCAAGTTAGGTTTTGTCA-3'
<i>SOD 2</i>	5'- GCCCTGGAACCTCACATCAA -3'	5'- GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT - 3'
<i>CAT</i>	5'- GATAGCCTT CGACCCAAGCA- 3'	5'- ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT -3'
<i>GPX</i>	5'- GGTTTTCATCTATGAGGGTGTTC - 3'	5'- GCCTTGGT CTGGCAGAGACT -3'

### 3.3.8. Parâmetros relacionados à inflamação

#### 3.3.8.1. Níveis de citocinas

As citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatória (IL-10) foram avaliadas via teste imunoenzimático ELISA após 72 horas de tratamento, utilizando-se o kit Quantikine®, conforme recomendações do fabricante. Inicialmente, foi adicionado 50 µL do diluente RD1W a cada poço da placa. Em seguida, os padrões dos testes e as amostras em análise foram adicionados nos respectivos poços, sendo a placa selada e incubada durante 1,5 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados duas vezes com solução de lavagem. O anticorpo primário foi então adicionado e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Logo em seguida, a placa foi lavada novamente e adicionou-se 100 µL de solução substrato da reação, com incubação de 20 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL da solução de paragem a cada poço e a densidade óptica foi determinada dentro de 30 minutos, utilizando um leitor de microplacas ajustado para 450 nm.

### 3.3.8.2. Análise da expressão gênica via das citocinas via *qRT-PCR*

Toda a metodologia utilizada está descrita no tópico 6.3.7.6 Análise da expressão gênica via das enzimas antioxidantes via *qRT-PCR*. A única diferença se refere aos primers utilizados para os testes que são específicos para as citocinas. A tabela 4 traz a sequência dos iniciadores utilizados para análise da expressão gênica.

**Tabela 4** – Iniciadores utilizados para análise da expressão gênica

Genes	Iniciadores	
	Sense	Antisense
<i>β-actina</i>	5'-TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA-3'	5'-TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA-3'
<i>IL-1β</i>	5'-GCGGCATCCAGCTACGAAT-3'	5'-ACCAGCATCTTCCTCAGCTTGT-3'
<i>IL-6</i>	5'-TACCCCCAGGAGAAGATTCCA-3'	5'-CCGTCGAGGATGTACCGAATT-3'
<i>TNF-α</i>	5'-CAACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'	5'-TATGGGCTCATACCAGGGTTTG-3'
<i>IL-10</i>	5'-GTGATGCCCAAGCTGAGA-3'	5'-TGCTCTTGTTTTACAGGGAAGA-3'

### 3.3.8.3. Análise dos dados

Os resultados obtidos foram tabelados em uma planilha do *Microsoft Excel* 2011 e submetidos à análise estatística através de teste de Anova de uma via, seguido de *post hoc* de Dunnet ou Tukey, utilizando o programa de produção de gráficos e estatístico Graph Pad Prim 5.0. Os tratamentos foram expressos como porcentagem do controle (%). Foram considerados resultados estatisticamente significativos àqueles onde p mostrou igual ou menor a 0,05.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. MANUSCRITO – 1

#### THE PROLIFERATIVE AND GENOTOXIC EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF *ILEX PARAGUARIENSIS* AQUEOUS EXTRACT IN SH-SY5Y NEURONAL CELLS AND MACROPHAGES RAW 264.7<sup>1</sup>

**Tábada Samantha Marques Rosa<sup>1\*</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>2</sup>, Thiago Duarte<sup>2</sup>, Euler E. Ribeiro<sup>3</sup>, Marta Medeiros Frescura Duarte<sup>4</sup>, Aron Ferreira da Silveira<sup>1</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>2,5</sup>, Fernanda Barbisan<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup>Postgraduate program of Disorders of Human Communication, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>3</sup>Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil

<sup>4</sup> Lutheran University of Brazil, Santa Maria- RS, Brazil

<sup>5</sup>Postgraduate program of Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

\*Corresponding author: Tábada Samantha Marques Rosa. Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria -RS, Brazil. ZipCode 97105900. Phone: +55-55-999053903, email: sa\_marqs@hotmail.com

---

<sup>1</sup> Manuscrito submetido a Toxicon

## ABSTRACT

Natural and low cost substances that can act protecting cells from oxidative stress, minimizing mitochondrial changes, inflammation and apoptosis, are strong candidates for the development of new therapeutic approaches of neuroprotection. we decided to evaluate the effects of yerba mate on neuronal cells and on macrophages. Human neuronal cells (SH-SY5Y) and macrophages (RAW 264.7) were exposed to different concentrations of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. The following parameters were evaluated: cell proliferation by the test of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and by cell cycle, genotoxicity analysis by 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and the apoptotic analysis by caspases 1, 3 and 8. In this study mitochondrial activity, was decreased in macrophage cell line treated with yerba mate extract at all concentrations, in neuronal cells there was an increase in the proliferative rate at concentrations of 1 and 10  $\mu\text{g/mL}$ . In general, the genotoxicity did not occur on exposure to the aqueous extract of yerba mate, in both cells. In the cell apoptosis, RAW 264.7 cells exposed to the aqueous extract of yerba mate were observed an increase in the levels of caspases 1, 3 and 8 in the highest concentrations, however in SH-SY5Y neuronal cells there was an increase in caspases 1 and 8, only at higher concentrations, and caspase 3 increased in all treatments. The aqueous extract of yerba mate, presented anti-inflammatory effect on macrophage cell line, and in neuronal cells, concentrations showed neuroprotective effect. high concentrations the water extract was able to induce apoptosis in both lineages, assuming a toxic dose-dependent effect

**Key words:** *Ilex paraguariensis*, Macrophages, DNA Damage, SH-SY5Y cell line

## 1. INTRODUCTION

The study of plants used in infusions and other beverages has gained importance in the world due to its potential bioactive and functional compounds (Farzaneh and Carvalho, 2015). The *Ilex Paraguariensis* is a South American tree, from which it is obtained the yerba mate (YM) (Márquez et al., 2013). YM is widely consumed in Argentina, south of Brazil, Paraguay and Uruguay, as a source of caffeine rather than tea and coffee (Bracesco et al., 2011). It forms the basis of the preparation of some very traditional and popular drinks, namely "chimarrão" (green and dry leaves prepared with hot water), "tererê" (green and dry leaves prepared with ice water) and mate tea (toasted leaves prepared with hot water or used to produce beverages) (Lima et al., 2014).

Among active compounds found in samples of *Ilex Paraguariensis*, caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is one of the most abundant. Caffeine is an antioxidant, anticarcinogenic, energizing, diuretic, stimulant, vasodilator, antiobesity and antitumor agent (Heck and De Mejia, 2007). However, the effects of caffeine on mammalian cells can be ambiguous and different in various cell types. Studies show that caffeine may stimulate cell proliferation or apoptosis, depending on the experimental model used, the duration of treatment and the concentration applied (Jafari and Rabbani, 2004).

In this same context, according to Laffon et al. (2017) cell cultures of neuronal origin, such as the neuroblastoma cell line (SH-SY5Y), have proved to be powerful tools for elucidating cellular and molecular mechanisms of nervous system development and physiology and as neurotoxicity models for evaluating the possible effects of chemicals *in vitro*. SH-SY5Y is widely used as an *in vitro* neuronal model for the exploration of toxic cellular mechanisms and neurotoxin screening (Coleman et al., 2002). These neuronal cells have the ability to proliferate for a long time without contamination, besides possessing many biochemical and functional characteristics of the neurons (Xie et al., 2010).

To evaluate the effects of inflammation caused by drugs and/or plant extracts the RAW 264.7 macrophages cell line is also used (Da Cruz et al., 2016). Thus, the use of an *in vitro* reproducible RAW 264.7 cell model allows for greater consistency in the study of the role of both inflammation and anti-inflammatory agents in disease models and, perhaps, a more fast renewal of new tools or pharmacological anti-inflammatory drugs (Tweedie et al., 2009). In a study, regular ingestion of chimarrão (YM aqueous extract) protected against DNA damage and

improved DNA repair activity (Bracesco et al., 2011). In addition, Muñoz-culla et al. (2016) concluded that YM may be useful in diseases with inflammatory components.

In this way, natural and low cost substances that can act protecting cells from oxidative stress, minimizing mitochondrial changes, inflammation and apoptosis, are strong candidates for the development of new therapeutic approaches of neuroprotection, in search of prevention and improvement (Halliwell, 2006). In this context, the various properties of aqueous extracts of yerba mate have been extensively investigated, however, studies on the potential cytotoxic effect of YM remain scarce (Boaventura et al., 2015). Considering that the experimental data on the genetic toxicity of yerba mate are obscure and contradictory, we decided to evaluate the effects of YM on SH-SY5Y neuronal cells and on RAW 264.7 macrophages.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. *Cell culture conditions and experimental design*

Human neuronal cells (SH-SY5Y) and macrophages (RAW 264.7) were obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC CRL-2266) and cultured under controlled conditions *in vitro*. The cells were exposed to different concentrations of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* (yerba mate). The YM concentrations were: 1-5-10-20-100ug/mL, and the treatments were performed in triplicate and in three independent experiments. The following parameters were evaluated: cell proliferation by the test of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and by cell cycle, genotoxicity analysis by 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and the apoptotic analysis by caspases 1, 3 and 8.

The neural cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM F12) (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) with 10% Fetal Bovine Serum (SBF) (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B (Invitrogen USA). The RAW 264.7 macrophage line was cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) also supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B. Cells were cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> until the amount required for the experiment was obtained. The treatments were performed to verify the proliferative capacity, genotoxicity and apoptosis of the YM extract.

## 2.2 *Cell proliferation*

Cellular proliferation was first evaluated by the MTT assay according to Dave et al. (2012). Through the MTT reagent (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolic bromide) at the concentration of 5 mg / mL diluted in phosphate buffer pH 7.4, which has the ability to enter the mitochondria forming intracellular formazan crystals of blue/violet coloration. Briefly, the supernatant from the treatments was removed and the cells resuspended in phosphate buffer (PBS, 0.01 M, pH 7.4). The MTT reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 5 mg/mL PBS and added to the plate which was incubated for 1 hour at 37°C. Thereafter, the supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in DMSO (Dimethylsulfoxide). Absorbance was read on a plate reader at 560 nm.

Another analysis used for cell proliferation was the cell cycle performed through flow cytometry. The cells were cultured to the  $1 \times 10^4$  confluency concentration, and then treated and incubated for 72 hours. After this time, the cells were trypsinized and washed twice with freezing PBS. After this procedure, cells were resuspended and fixed in 70% freezing ethanol for 15 minutes, and stored at -40°C until analyzed. At the time of analysis, the ethanol was aspirated and the cellular precipitates were washed twice with freezing PBS. The cells were incubated in Propidium Iodide (PI) solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), RNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and Triton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 40 minutes at 37°C. After this procedure, the cells were resuspended in PBS and read by flow cytometry. The cell cycle is determined by the amount of DNA stained by PI at 575/26 nm, and 610/20nm, 670/14nm channels in the BD LSRII and the 575/26nm channel in the BD FACSCanto II (Azzolin et al., 2016).

## 2.3 *Analysis of genotoxicity and cell apoptosis*

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is a product of the oxidation of damaged DNA formed by hydroxyl radical, oxygen and photodynamic action. The analysis of caspases, which are apoptotic markers, were evaluated by ELISA using the Quantikine® kit, according to the manufacturer's recommendations. Initially, 50 µL of the RD1W diluent was added to each well of the plate. Then the test standards and the samples under analysis were added into

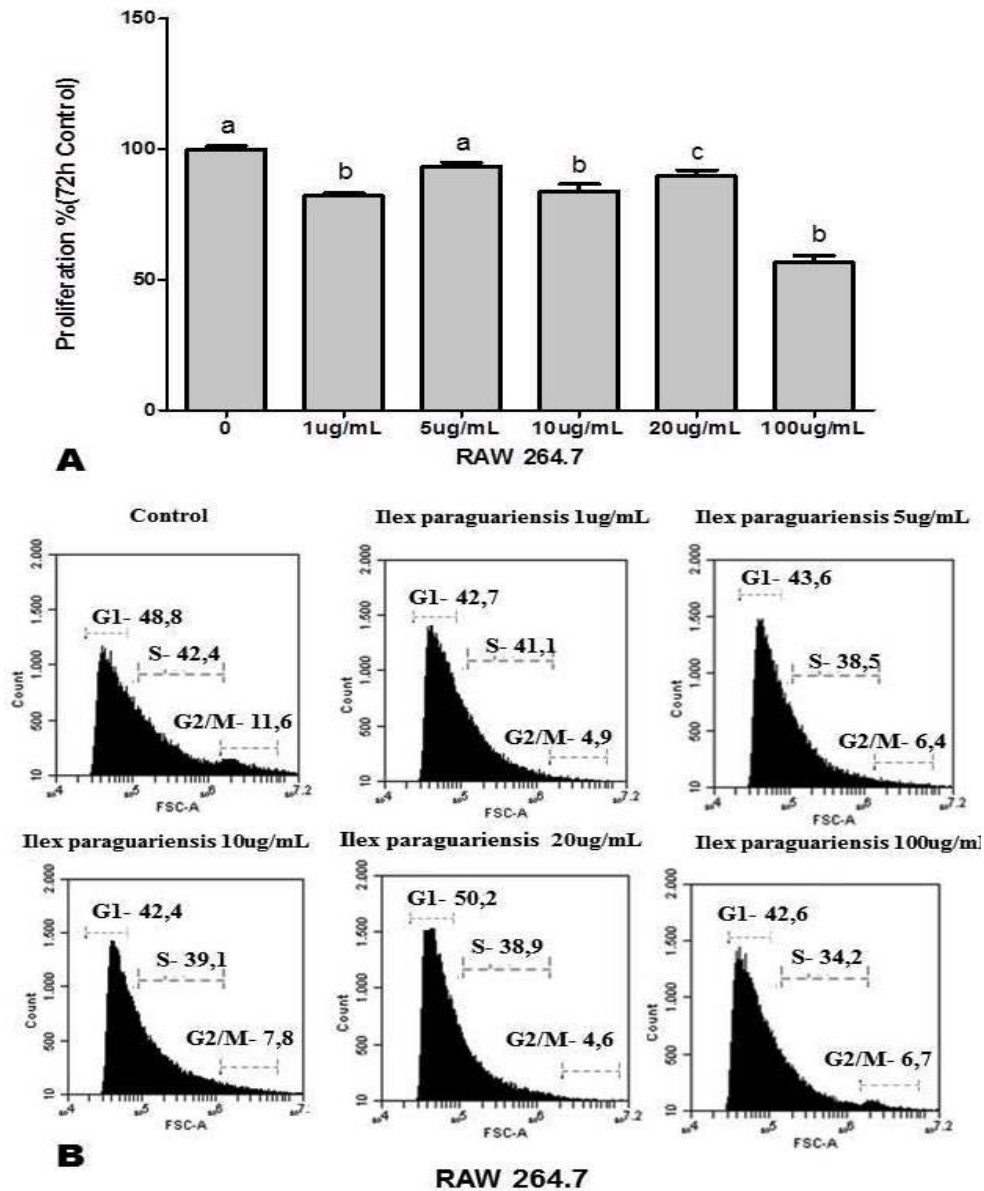
the respective wells, the plate sealed and incubated for one and a half hours at room temperature. Subsequently, the supernatant was removed and the wells were washed twice with wash solution. The primary antibody was then added and incubated for 30 minutes at room temperature. The plate was then washed again and 100  $\mu\text{L}$  of reaction substrate solution was added, with incubation for 20 minutes at room temperature. After the incubation period, 50  $\mu\text{L}$  of the stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 minutes using a microplate reader set at 450 nm.

#### 2.4 *Statistical analysis*

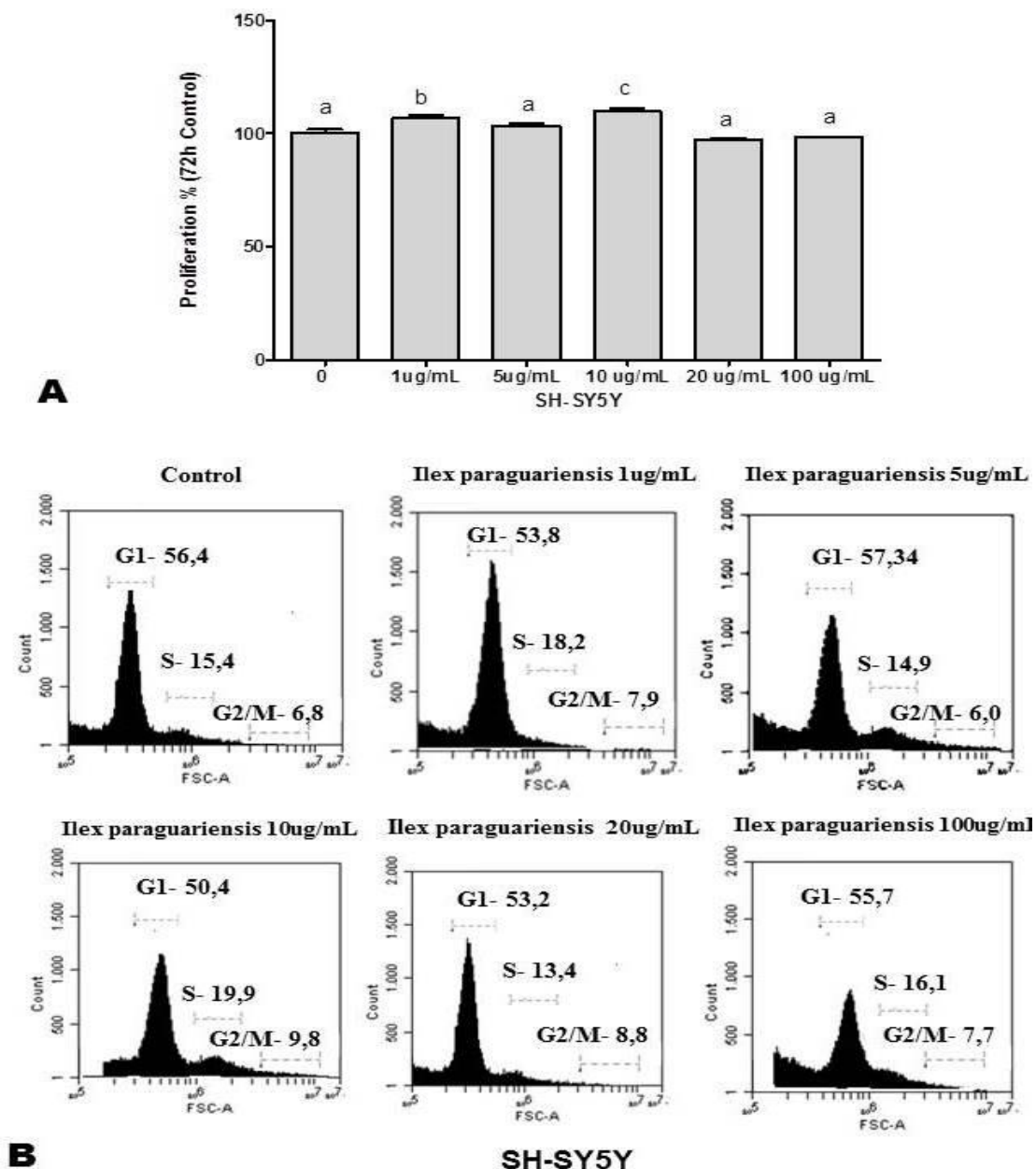
All assays were performed in triplicate, and statistical analyzes were performed using Graph Pad Prism 5 software. Results of the individual treatments were compared using a one-way analyses (ANOVA), followed by Dunnet's post *hoc test*. The results of these analyzes were expressed as a percentage of the control. The results with  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. **RESULTS**

The effect of some compounds present in plant extract can cause modulation in the cell cycle and an increase or decrease in the rate of cell proliferation. In this study mitochondrial activity, estimated by the MTT assay, was decreased in macrophage cell line (RAW 264.7) treated with YM extract at all concentrations except 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , in neuronal cells (SH-SY5Y) there was an increase in the proliferative rate at concentrations of 1 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in relation to the control (Figures 1A and 2A). These results were confirmed by cell cycle analysis by flow cytometry, which showed that YM extract in RAW 264.7 cells had a decrease in cell proliferation at all concentrations, with reduction in the frequency of S phase. In SH-SY5Y cells, the increase in cell proliferation at concentrations of 1 and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was confirmed, with an increase in S phase frequency (Figure 2B).



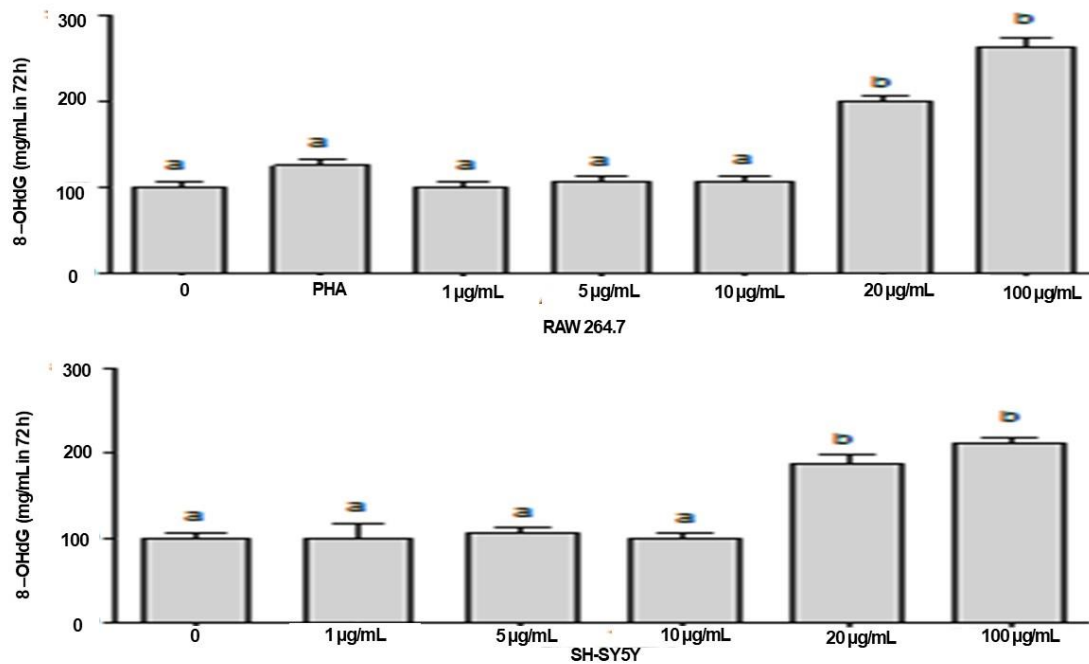
**Figure 1:** Effect on the cell proliferation of different concentrations of the aqueous extract of maté, analyzed through the tests of MTT and cell cycle in cells of rat macrophages (RAW-264.7). Cell proliferation through the MTT test, between cultures exposed to different concentrations of Erva-mate (A). Representative cell cycle graphs from flow cytometric analysis (B). The treatments were compared statistically by analysis of variance followed by Dunnet's *post hoc* test. Significant differences were considered where  $p \leq 0.05$  between treatments, and were identified by the use of different.



**Figure 2:** Effect on the cell proliferation of different concentrations of the aqueous extract of mate, analyzed by MTT and cell cycle tests in neural cells (SH-SY5Y). Cell proliferation through the MTT test, between cultures exposed to different concentrations of YM (A). Representative cell cycle graphs from flow cytometric analysis (B). The treatments were compared statistically by analysis of variance followed by Dunnet's *post hoc* test. Significant differences were considered where  $p \leq 0.05$  between treatments, and were identified by the use of different letters.

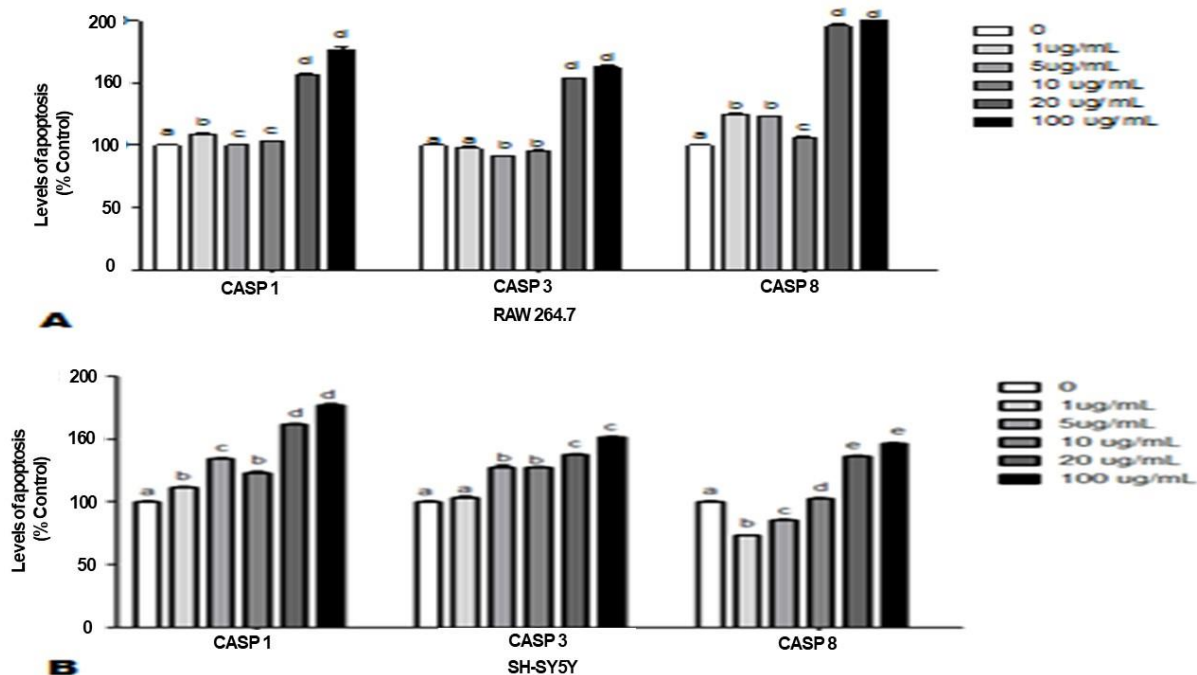
In general, genotoxicity did not occur on exposure to the aqueous extract of YM, except at the highest concentrations of 20 and 100  $\mu\text{g/mL}$  in both RAW 264.7 cells (Figure 3A) and SH-SY5Y cells (Figure 3B) which was analyzed by the quantification of 8-OHdG levels.





**Figure 3:** Genotoxic effect of yerba mate extract at different concentrations on mice macrophages (RAW 264.7) (A) and neural cells (SH-SY5Y) (B) observed DNA damage by the test of 2-hydroxy- 8-deoxyguanosine. The treatments were compared statistically by analysis of variance followed by Dunnet's *post hoc* test. Significant differences were considered where  $p \leq 0.05$  between treatments, and were identified by the use of different letters.

In the cell apoptosis, RAW 264.7 cells exposed to the aqueous extract of YM were observed an increase in the levels of caspases 1, 3 and 8 in the highest concentrations 20 and 100 µg/mL, however in SH-SY5Y neural cells there was an increase in caspases 1 and 8, only at higher concentrations, and caspase 3 increased in all treatments except 1 µg/mL (Figure 4A and B).



**Figure 4:** Effect on the cellular apoptosis of yerba mate extract at different concentrations in mice macrophage (RAW 264.7) (A) and neural cell (SH-SY5Y) (B) cells by Elisa immunoassay test analysis of apoptotic markers. The treatments were compared statistically by analysis of variance followed by Dunnet's *post hoc* test. Significant differences were considered where  $p \leq 0.05$  between treatments, and were identified by the use of different letters.

#### 4. DISCUSSION

In relation to macrophage cell line (RAW 264.7) and neuronal cells (SH-SY5Y) treated with YM extract, there was, respectively, a decrease and an increase in the rate of cell proliferation. Leonard et al. (2010) stated that YM protected and reduced DNA damage as well as inhibited lipid peroxidation induced by the hydroxyl radical in RAW 264.7 cells. Another review study also suggested that YM may protect against DNA damage and repair (Bracesco et al., 2011). This can be explained by the fact that YM has a high concentration of polyphenolic components, which act as antioxidants, thus providing a protection against free radical damage (Alvarez et al., 2002).

Concerning genotoxicity from aqueous extract of YM, in general, did not occur in both RAW 264.7 cells and SH-SY5Y cells, except at the highest concentrations (20 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A similar study, using human lymphocytes *in vitro*, observed a cytotoxic activity of YM extract at the highest concentrations (100 and 1000  $\text{g}/\text{mL}$ ) against these cells that was mainly due to caffeine and therefore not exclusive to YM (Alves et al., 2008, Wnuk et al., 2009). In addition, no genotoxic effect of YM (175-1400  $\text{g}/\text{mL}$ ) on human lymphocytes has been reported by Alves et al. (2008).

In the same context, Ramirez-Mares et al. (2004) performed experiments using a human liver cancer cell line to verify if the *in vitro* preventive chemo activity consists of cytotoxicity, Ornithine Decarboxylase (ODC) or Quinone Reductase activity (QR). The results of this study are of great relevance if we consider that cytotoxicity is highly associated with anticancer activity and suggests that *Ilex paraguariensis* exerts greater cytotoxicity against human liver cancer cells when compared to other plant extracts such as green tea. Rutin and quercetin are compounds that have shown cytotoxicity in human liver cancer cells, and although they are found in small concentrations in *Ilex paraguariensis*, they integrate the diversity of flavonoids present in YM that may contribute to its potential anticancer effect (Alía et al., 2006).

According to Souza et al. (2015) this contributes to the potential cytotoxic effect of *Ilex paraguariensis* extracts on tumor cells. In the current research, it was found that the aqueous extracts of YM at higher concentrations (20 and 100 µg/mL) caused an increase in caspases and the activation of apoptosis in SH-SY5Y neural cells and in RAW 264.7 macrophages. Similar data were found by Ramirez-Mares et al. (2016) in which the *Ilex paraguariensis* in the highest concentration (100 µl) used in the study demonstrated significant apoptotic activity against tumor cells (HaCaT and SCC-61) with approximately 25 and 32% of apoptotic cells, respectively. According to Ghobrial et al. (2005), apoptosis can be induced by an extrinsic pathway (death of receptors) or by intrinsic pathways (mitochondria). The receptor-mediated pathway of cell death is initiated by the interaction with its receptors, which leads to cleavage and activation of the initiator (caspase 8 and 10), which in turn cleave and activate the caspase 3, 6 and 7, and thus apoptosis occurs.

## 5. CONCLUSION

The aqueous extract of yerba mate, in all concentrations presented anti-inflammatory effect on macrophage cell line (RAW 264.7), and in neuronal cells (SH-SY5Y), the smallest concentrations showed neuroprotective effect. However, it is important to note that in high concentrations the water extract was able to induce apoptosis in both lineages, assuming a toxic dose-dependent effect. In this way, more studies need to be conducted to confirm these results.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCE

- Alfía, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A.B., Bravo, L., Goya, L. 2006. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 212(1):110–118.
- Alvarez, S., Zaobornyj, T., Actis-Goretta, L., Fraga C.G., Boveris, A. 2002. Polyphenols and red wine as peroxynitrite scavengers: a chemiluminescent assay. *Ann N Y Acad Sci*. 957(1):271–273.
- Alves, R.J., Jotz, G.P., Do Amaral, V.S., Montes, T.M., Menezes, H.S., De Andrade, H.H. 2008. The evaluation of maté (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. *Toxicol In Vitro*. 22(3): 695–698.
- Azzolin, V.F., Cadoná, F.C., Machado, A.K., Berto, M.D., Barbisan, F., Dornelles, E.B., Glanzner, W.G., Gonçalves, P.B., Bica, C.G., Da Cruz, I. B. 2016. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol In Vitro*. 32(1):8-15.
- Boaventura, B.C.B., Amboni, R.D.M.C., Da Silva, E.L., Prudencio, E.S., Pietro, P.F.D., Malta, L.G., Polinati, R.M., Liu, R.H. 2015. Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. *Food Research International*. 77(2):257-263.
- Bracesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gugliucci, A. 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J Ethnopharmacol*. 136(3): 378-384.
- Coleman, M.D., O'neil, J.D., Woehrling, E.K., Ndunge, O.B.A., Hill, E. J., Menache, A., Reiss, C.J. 2002. A preliminary investigation into the impact of a pesticide combination on human neuronal and glial cell lines in vitro. *PLoS One*. 7(8): e42768.
- Da Cruz Jung, I.E., Machado, A.K., Da Cruz, I.B., Barbisan, F., Azzolin, V.F., Duarte, T., Duarte, M.M., Do Prado-Lima, P.A., Bochi, G.V., Scola, G., Moresco, R.N. 2016. Haloperidol and risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. *Psychopharmacology*. 233(9):1715-1723.
- Dave, S., Kaur, N.J., Nanduri, R., Dkhar, H.K., Kumar, A., Gupta, P. 2012. Inhibition of Adipogenesis and Induction of Apoptosis and Lipolysis by Stem Bromelain in 3T3-L1 Adipocytes. *Plos One*. 7(1):e30831.
- De Mejia, E.G., Song, Y.S., Heck, C.I., Ramirez-Mares, M.V. 2010. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolic, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *Journal of Functional Foods*. 2(1):23-34.
- Farzaneh, V., Carvalho, I.S. 2015. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Industrial Crops and Products*. 65(1):247-258.

- Fonseca, C.A., Otto, S.S., Paumgarten, F.J., Leitão, A.C. 2000. Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrao (*Ilex paraguariensis*). *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 19(4):333–346.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 55(1):178–194.
- Halliwell, B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 97(6): 1634–1658.
- Heck, C.I., De Mejia, E.G. 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 72(9):138–151.
- Jafari, M., Rabbani, A. 2004. Studies on the mechanism of caffeine action in alveolar macrophages: caffeine elevates cyclic adenosine monophosphate level and prostaglandin synthesis. *Metabolism.* 53(6):687–692.
- Laffon, B., Fernández-Bertólez, N., Costa, C., Pásaro, E., Valdiglesias, V. 2017. Comparative study of human neuronal and glial cell sensitivity for in vitro neurogenotoxicity testing. *Food Chem Toxicol.* 102(1):120-128.
- Leitão, A.C., Braga, R.S. 1994. Mutagenic and genotoxic effects of mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. *Braz J Med Biol Res.* 27(7):1517–1525.
- Leonard, S.S., Hogans, V.J., Coppes-Petricorena, Z., Peer, C.J., Vining, T.A., Fleming, D.W., Harris, G.K. 2010. Analysis of free-radical scavenging of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) using electron spin resonance and radical-induced DNA damage. *J Food Sci.* 75(1): C14-C20.
- Lima, N.S., Oliveira, E., Silva, A.P.S., Maia, L.A., Moura, E.G., Lisboa, P.C. 2014. Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. *Life Sci.* 115(1-2):29–35.
- Márquez, V., Martínez, N., Guerra, M., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E. 2013. Characterization of aroma-impact compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using GC–olfactometry and GC–MS. *Food Research International.* 53(2):808–815.
- Muñoz-Culla, M., Sáenz-Cuesta, M., Guereca-Barandiaran, M.J., Ribeiro, M.L., Otaegui, D. 2016. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) inhibits lymphocyte activation in vitro. *Food Funct.* 7(11):4556-4563.
- Ramirez-Mares, M.V., Chandra, S., De Mejia, E.G. 2004. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research.* 554(1):53–65.
- Ramirez-Mares, M.V., Kobayashi, H., De Mejia, E.G. 2016. Inhibitory effect of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts on the proliferation of human head and neck squamous carcinoma cells. *Toxicol Rep.* 3(1):269-278.

Souza, A.H.P., Corrêa, R.C.G., Barros, L., Calhelha, R.C., Santos-Buelga, C., Peralta, R.M., Bracht, A., Matsushita, M., Ferreira, I.C.F.R. 2015. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. *Food Res Int.* 78(1):286-294.

Tweedie, D., Luo, W., Short, R.G., Brossi, A., Holloway, H.W., Li, Y., Yu, Q.S., Greig, N.H. 2009. A cellular model of inflammation for identifying TNF-alpha synthesis inhibitors. *J Neurosci Methods.* 183(2):182-187.

Xie, H.R., Hu, L.S., Li, G.Y. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl).* 123(8): 1086-1092.

Wnuk, M., Lewinska, A., Oklejewicz, B., Bugno, M., Slota, E., Bartosz, G. 2009. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res.* 679(1-2):18-23.

## 4.2. MANUSCRITO – 2

***IN VITRO* ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF *ILEX PARAGUARIENSIS*  
ON RAW MACROPHAGES 264.7<sup>2</sup>**

**Tábada Samantha Marques Rosa<sup>1</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>2</sup>, Fernanda Barbisan<sup>3</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>2</sup>, Moisés Henrique Mastella<sup>3</sup>, Thiago Duarte<sup>2</sup>, Euler E. Ribeiro<sup>4</sup>, Marta Medeiros Frescura Duarte<sup>5</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>2,3</sup>, Aron Ferreira da Silveira<sup>1\*</sup>.**

<sup>1</sup>Postgraduate program of Disorders of Human Communication, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>3</sup>Postgraduate program of Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>4</sup>Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil

<sup>5</sup>Lutheran University of Brazil , Santa Maria- RS, Brazil

\*Corresponding author: Aron Ferreira da Silveira. Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria - RS, Brazil. ZipCode 97105900. Phone: +55-55-999612454, email: aronfer@gmail.com

---

<sup>2</sup> Manuscrito submetido para Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism

## ABSTRACT

Ilex Paraguariensis beverages to have various biological activities, which have been attributed to the high rates of polyphenol, methylxanthines and saponins. The objective of study is to evaluate the effect of the aqueous extract of Ilex Paraguariensis in an in vitro model of inflammation using the RAW 264.7 cell line. Different concentrations of Ilex Paraguariensis were analyzed for the effect on cell viability. Here the phytohemagglutinin was used as an inducer of inflammation. The was investigated pharmacogenomics effect on gene modulation of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10, cytokines levels and Cell proliferation. At the highest concentration the yerba mate decreased cell viability. The highest concentrations de yerba mate led to a significant increase in the protein levels of caspases 1, 3 and 8. The inflammatory activation of the RAW 264.7 lineage was confirmed by cell spreading analysis. Regarding the gene expression and levels protein, highest concentrations of aqueous extract of Ilex paraguariensis, the reversal of inflammation was more intense . In relation to the anti-inflammatory cytokine IL-10, the concentrations of 1 and 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  of yerba mate did not cause an increase in the expression of this gene. The data confirmed that phytohemagglutinin treatment did indeed induce a proliferative state and that treatment with Ilex Paraguariensis triggered an anti-inflammatory response in these macrophages cells. The Ilex Paraguariensis, in low concentrations, seems to present an anti-inflammatory effect and to be considered a candidate plant for the prevention and treatment of neurodegenerative and metabolic diseases associated with inflammatory and oxidative processes.

**Key words:** Ilex paraguariensis, Inflammation, Macrophages, Cytokines, Cell Death, Toxicity, Gene Expression, Oxidative stress



## 1. INTRODUCTION

*Ilex Paraguariensis*, popularly known as Yerba Mate (YM), it is a plant used as tea-like beverage made through dried leaves and widely consumed in South America, mainly in Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. In the last few years, the interest in YM properties and their effect on the organism has grown considerably in the scientific community, as shown by the increasing number of studies (Muñoz-Culla et al. 2016).

The aqueous extract of YM is mainly used in prepare of different beverages: chimarrão, tererê and mate tea, where the first is prepared with hot water, and the second with cold water. Mate tea is prepared with dry leaves and brewed like any other herbal tea (Gambero and Ribeiro 2015).

*Ilex paraguariensis* is a plant that has a wide nutritional profile, since its extract contains numerous vitamins such as vitamin A, C, E and B vitamins and minerals such as potassium, magnesium, calcium, manganese, iron, selenium, phosphorus and zinc, among others. In addition, YM has volatile chemical compounds and many polyphenols, mainly caffeine derivatives, such as chlorogenic acid, and some flavonoids, such as rutin, quercetin, kaempferol and luteolin. In addition to polyphenols, YM still contains saponins and methylxanthines, which are attributed many of the pharmacological properties (Heck and De Mejia 2007; Bracesco et al. 2011).

*Ilex Paraguariensis* beverages have been reported to have various biological activities, which have been attributed to the high rates of polyphenol, methylxanthines and saponins (Bastos et al. 2007).

The interest in the potential use of YM for health promotion is relatively recent: was in the middle of 1990s the first work that demonstrated the antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of infusions of 47 dried green herbs (chimarrão) (Gugliucci e Stahl, 1995; Gugliucci, 1996). In the study by Bastos et al. (2007), the green and dried herb extracts presented *in vitro* antioxidant

activity superior to that of green tea (*Camelia sinensis*). Other research has shown that beverage mate has antioxidant activity equivalent or superior to vitamin C and vitamin E, substances considered as the standard for this property (Laranjinha et al. 1994; Vinson and Dabbagh 1998; Schinella et al. 2000; Gugliucci and Menini 2002; Ramirez-Mares et al. 2004). In addition, were found properties of anti-inflammatory activity (Miranda et al. 2008; Berté et al. 2011; Borges et al. 2013), anti-obesity (Arçari et al. 2009; Arçari et al. 2011; Borges et al. 2013) and reduction of blood lipids (Gao et al. 2013).

Since there are very few studies in the literature that analyze the anti-inflammatory activity in cell lines, the effect of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*, prepared just like the chimarrão, could be relevant to analysis.

Thus, the objective of the present study is to evaluate the effect of the aqueous extract of YM in an *in vitro* model of inflammation using the RAW 264.7 cell line. The use of such non-human lineage sought to avoid the interference of genetic factors, and lifestyle.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1 Cell Culture Conditions and Experimental Design*

RAW 264.7 macrophages (ATCC TIB-71) were used as *in vitro* experimental model. We choose to perform the analysis using a non-human cell line to avoid any potential genetic interference in the results obtained from treatments. The cells were cultured with DMEM medium supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 mg/mL) and antifungal amphotericin B. All experiments were performed at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> incubator and were three times replicated. Initially,  $1 \times 10^5$  cells were seeded in 6-well plates and allowed to adhere for 24 h. All reagents used in cell culture are from Sigma

Aldrich (USA), whereas experiments were performed using commercial formulation of the *Ilex Paraguariensis*.

The aqueous extract was prepared in a similar way to that of the chimarrão, and to determine the main molecules present were performed the analysis through high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) using the Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) system (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Initially the different concentrations of *Ilex Paraguariensis* were analyzed for the effect on cell viability. PHA (phytohemagglutinin) as positive control of macrophages inflammatory response at 40 µg/mL concentration. PHA is a lectin antigen found in some plants that is able to induce mitosis and inflammatory response in immune cells (Barbisan et al. 2017). Here the PHA was used as an inducer of inflammation, and the cells were added 24 hours before of *Ilex Paraguariensis*, thus triggering inflammatory activation of the macrophages.

Macrophage activation after 24 h of exposure to PHA was confirmed by observing the cells under optical microscopy, since activate cells alter their morphological conformation Da Cruz Jung et al. (2016). A concentration-effect of the aqueous infusion of *Ilex Paraguariensis* was performed at the following concentrations: 1, 5, 10, 20, 100 µg / mL.

The following parameters were used to evaluate the potential for inflammatory modulation by aqueous infusion of *Ilex paraguariensis* in cell culture macrophages: The pharmacogenomic effect on the gene modulation of IL-1β, IL-6 and IL-10 cytokines studied here was investigated by qRT -PCR and cytokine levels by immunoassay. Cellular apoptosis markers via caspases (through the immunoassay test). And cell viability and proliferation was determined by the MTT assay.

## 2.2 Obtaining the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* and HPLC-DAD

The extract of *Ilex paraguariensis* was obtained by infusing 100 g of powder, dried sample, into 1000 mL of distilled water and deionized for 10 minutes of infusion at a temperature of approximately 90°C and 3 gentle shaking (sometimes 0 , 5 and 10 '). After extraction, the resulting solution was filtered through filter paper n°. 8, placed in amber glass (1.5 L capacity), the vessel protected from light, stored at -8 ° C, and then lyophilized. The extract produced was equivalent to the instant tea and was kept at -20°C in plastic tubes, sealed with parafilm and protected from light until used in the experiments. To determine the main molecules present in *Ilex paraguariensis* aqueous extract we performed the analysis through high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) using the Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) system (Shimadzu, Kyoto, Japan) as described in Machado et al. (2016).

## 2.3 Cell viability and proliferation assay

Cell viability was measured in cells not activated by PHA after 24 hours of contact cells and *Ilex Paraguariensis*.

The inflammatory status of the cells was confirmed by measuring the proliferative rate of the cell cultures at 72 h. In general, in activated cells the proliferation rate is higher than in non-activated cells. This last experiment was conducted to validate the anti-inflammatory effects of aqueous extract of *Ilex Paraguariensis*. Cell viability (24h) and Cell proliferation (72h) was determined using an MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] spectrophotometric assay, as described by Berto et al. (2015). For this assay, the cells were incubated for 1 hour with MTT reagent. After, the formazan salt that

was formed was dissolved in Dimethylsulfoxide (DMSO), its absorbance was measured at 560 nm in a 96-well microplate.

#### *2.4 mRNA expression analysis by quantitative QT-PCR assay*

The gene expression of these cytokines was determined by quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis by Rotor-Gene Q5 plex HRM System (QIAGEN Biotechnology, Germany). Total RNA of each treatment was extracted using Trizol, (Invitrogen Life Technologies, USA). To perform reverse transcription, RNA was added to the samples of RNA (1000 ng/ $\mu$ L) with 0.2  $\mu$ L of DNAase (Invitrogen Life Technologies, USA) at 37°C for 5 minutes, followed by heating at 65°C for 10 minutes. The cDNA was generated with 1  $\mu$ L of Iscript cDNA and 4  $\mu$ L of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA) according to the following reaction conditions: 5°C for 10 minutes, 25°C for 5 minutes, 85°C for 5 minutes and finally 5°C for 60 minutes.

The qRT-PCR was conducted under the following reaction conditions: 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s followed by a melt curve of 60°C to 90°C in 0.5°C increments for 5 s. The q RT-PCR reactions of each sample were made in triplicate, using 1  $\mu$ M of each primer, 1000 ng/ $\mu$ L of cDNA, RNAase-free water and 2x QuantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN Biotechnology, Germany), in a final volume of 20  $\mu$ L. The beta-actin gene was used as a cleaning gene, and its expression level was used as an internal control. The relative expression was calculated using the comparative Cytosine-Timine (CT) and was expressed for showed compared to the control.

The specific primer pairs of cytokines used in this study were: IL-1 $\beta$  Forward GCGGCATCCAGCTACGAAT and Reverse ACC AGCATCTTCCTCAGCTTGT; IL-6 Forward TACCCCCAGGAGAAGATTCCA and Reverse

CCGTCGAGGATGTACCGAATT; IL-10 Forward GTGATGCCCCAAGCTGAGA and Reverse TGCTCTTG TTTTCACAGGGAAGA.

### *2.5 Caspase and cytokine immunoassays*

The analyses of caspase 1, 3 and 8 and cytokines IL-1b, IL-6, and, IL-10 were performed using the Quantikine Human Caspase Immunoassay to measure CASP in the cell culture supernatants, according to the manufacturer's instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed. The assay diluent RD1W was added (50  $\mu$ L) to each well. Further, 100 mL of standard control for our sample was added per well, after which well was covered with the adhesive strip and incubated for 1.5 h at room temperature. Each well was aspirated and washed twice for a total of three washes. The antiserum of each molecule analyzed here was added to each well and covered with a new adhesive strip and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated, and the caspase-1 conjugate (100 mL) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated and 200 mL of substrate solution was added to each well and incubated for 20 min at room temperature. Finally, the 50 mL stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm.

### *2.6 Statistical Analysis*

owingAll assays were performed in independent experiments in triplicate. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 5 software. Treatment results were compared using one-way ANOVA, followed by Tukey or Dunnet *post-hoc* tests using GraphPad (software

GraphPad Prism, version 5.0, 2015). The treatments were compared statistically by analysis of variance followed by Dunnet's post hoc test. Significant differences were considered where the  $p \leq 0.5$ .

### 3. RESULTS

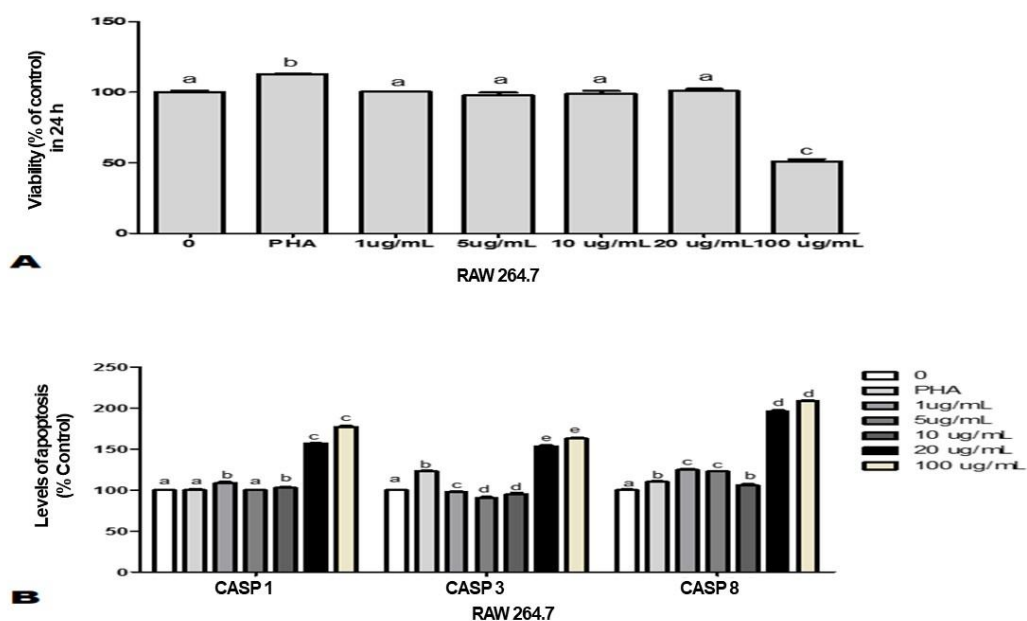
The quantification by HPLC-DAD of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* showed a high concentration of polyphenols, alkaloids and tannins as can be observed in (Table 1).

**Table 1:** Bioactive compounds concentration of hot-aqueous extract of *Ilex paraguariensis*

Compounds	Yerba mate
Total polyphenols	510.9 ± 42.2
Alkaloids	128.6 ± 1.0
Tannins hydrolysed	770.9 ± 71.2
Tannins condensed	15.9 ± 4.2
Caffeine (extract µg/0.002 g)	89.9 ± 3.4
Caffeine (dry weight/ mg.100 g <sup>-1</sup> )	533.1 ± 23.3
Theobromine (extract µg/0.002 g)	19.9 ± 3.1
Theobromine (dry weight mg.100 g <sup>-1</sup> )	113.8 ± 14.0

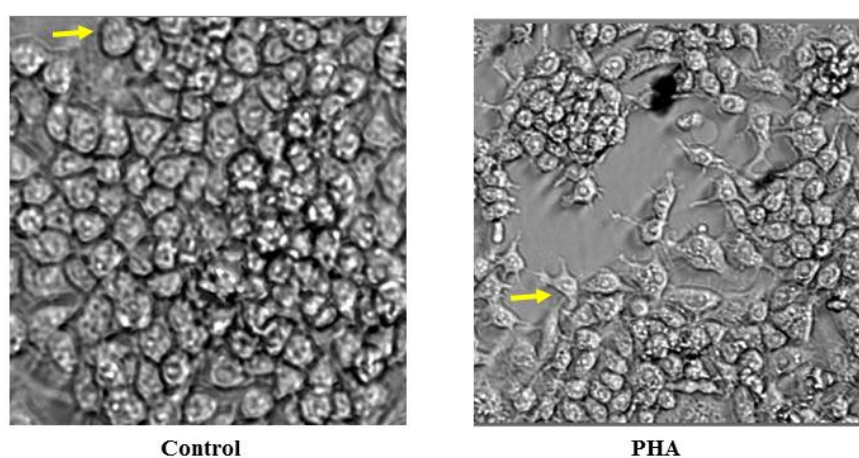
Caffeine; theobromine and total catechin were quantified by HPLC; Data are present as mean ± SD.

Initially, the effects of yerba mate on the viability of activated macrophages (24 h) were evaluated. Only at the highest concentration (100 µg / mL) YM decreased cell viability (Figure 1A). In Figure 1B, the highest concentrations of YM (20 and 100µg / mL) led to a significant increase in the protein levels of caspases1, 3 and 8.



**Figure 1** - Cell viability analysis via MTT colorimetric test (A). Protein levels of Caspases 1, 3 and 8 (B). Treatments were compared using a One-way analysis of variance followed by a *post hoc* Dunnet test. The different letters (a, b, c) indicate statistical differences for each treatment at  $p \leq 0.05$ .

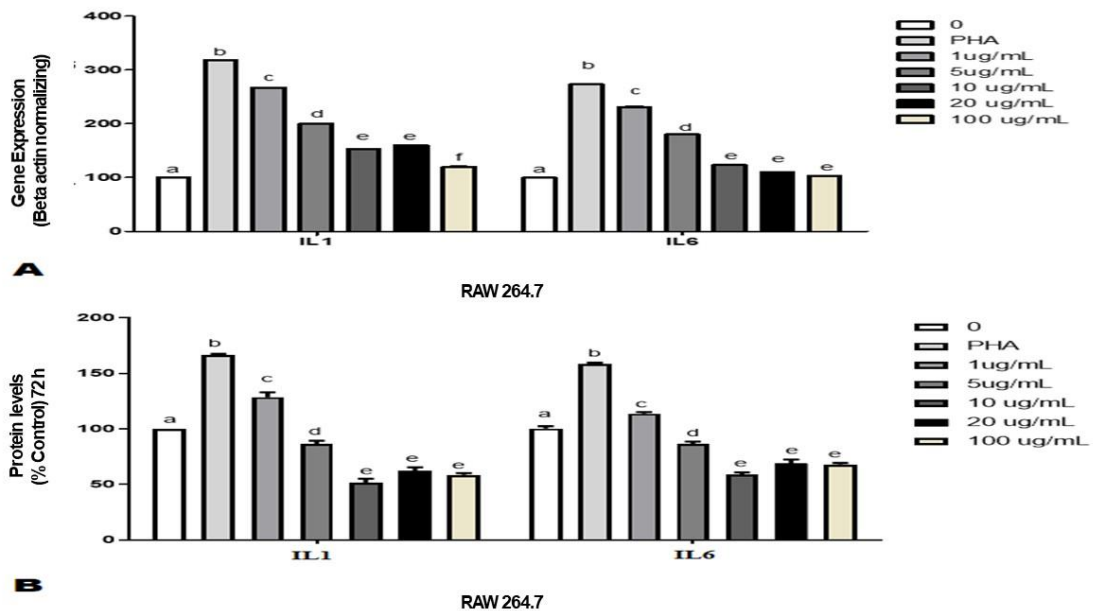
The inflammatory activation of the RAW 264.7 lineage by PHA treatment was confirmed by cell spreading analysis (Figure 2). Since in non-inflamed conditions such cells have rounded phenotype, the morphological alteration called spreading was seen when star-shaped morphology was acquired.



**Figure 2-** Macrophage activation after 24 h of exposure to PHA. RAW 264.7 monocyte inactivated cells ( $\times 40$ ), scale bar=20  $\mu\text{m}$  (A). Macrophage activation observed by change of cell morphological patterns (arrow) ( $\times 40$ ) (B). Fluorescence Microscope.



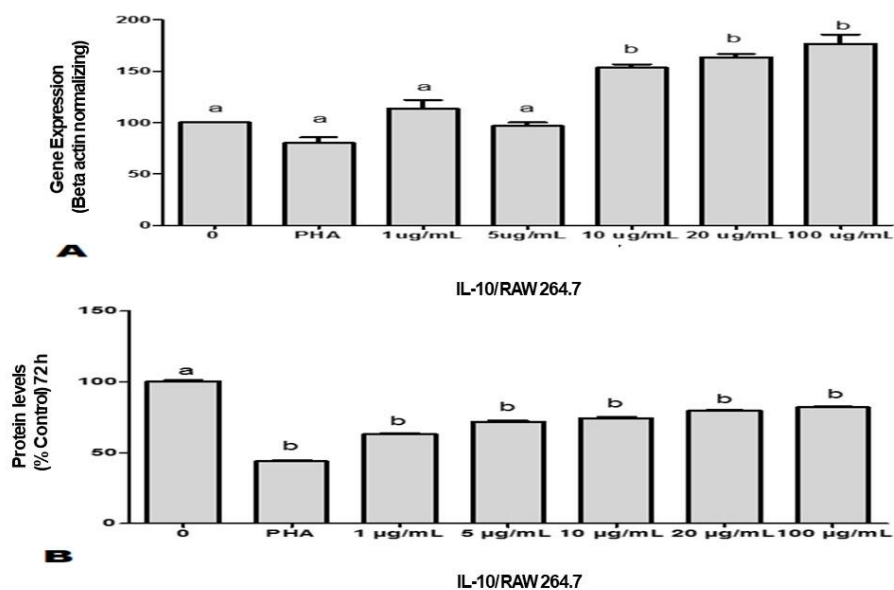
Regarding the gene expression analyzed by qRT-PCR, the effect of maturation on the treatment of RAW 264.7 macrophages, previously activated for PHA inflammation, was concentration dependent, being that in the highest concentrations of aqueous extract of *Ilex paraguariensis* (10-20 - 100 $\mu$ g / mL), the reversal of inflammation caused by PHA was more intense (Figure 3A). The results were practically repeated in relation to the protein levels of such cytokines (Figure 3B).



**Figure 3:** Effect of the aqueous extract of *Ilex Paraguariensis* on the proinflammatory cytokines IL-1 and IL-6. Gene expression via qRT-PCR (A). Analysis of Protein levels via Immunoassay (B). Treatments were compared using a One-way analysis of variance followed by a *post hoc* Dunnet test. The different letters (a, b, c) indicate statistical differences for each treatment at  $p \leq 0.05$ .

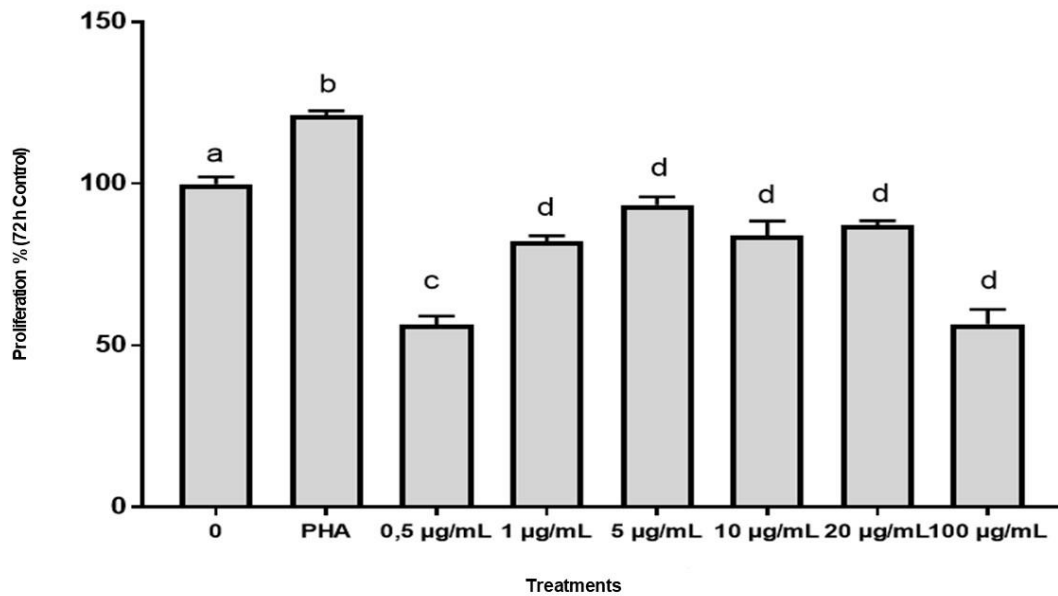
In relation to the anti-inflammatory cytokine IL-10, the concentrations of 1 and 5  $\mu$ g / mL of YM did not cause an increase in the expression of this gene, however at the concentrations of 10, 20 and 100  $\mu$ g / mL of YM induced up regulation in the gene (Figure 4A).

Again, the protein levels analyzed by immunoassay complement the results obtained in the analysis of gene expression (Figure 4B).



**Figure 4-** Effect of the aqueous extract of *Ilex Paraguariensis* on the anti-inflammatory cytokine IL-10. Gene expression via qRT-PCR (A). Analysis of Protein levels via Immunoassay (B). Treatments were compared using a One-way analysis of variance followed by a *post hoc* Dunnet test. The different letters (a, b, c) indicate statistical differences for each treatment at  $p \leq 0.05$ .

Finally, cell proliferation was evaluated in 72 hours cell cultures to confirm that culture conditions elicited an inflammatory response in RAW 264.7 macrophages (Figure 5). The data confirmed that PHA treatment did indeed induce a proliferative state and that treatment with *Ilex Paraguariensis* triggered an anti-inflammatory response in these macrophages cells. However, the concentration of aqueous extract used influenced the results (Figure 5).



**Figure 5-** Effect on the inflammatory response to PHA in 72 h cell cultures of RAW 264.7 macrophages, and the anti-inflammatory effect of *Ilex Paraguariensis*. Treatments were compared using a One-way analysis of variance followed by a *post hoc* Dunnet test. The different letters (a, b, c) indicate statistical differences for each treatment at  $p \leq 0.05$ .

#### 4. DISCUSSION

Our results demonstrate a strong anti-inflammatory effect of the aqueous extract of *Ilex Paraguariensis* on RAW 264.7 macrophages, however this effect is concentration dependent, since the higher concentrations of 20 and 100 µg / mL apparently have caused some level of toxicity the cells.

Results corroborate a study by Muñoz-Culla et al. (2016), describing the *in vitro* toxicity of YM in peripheral blood polymorphic cells, where in the presence to 100 µg / mL, cell death increased considerably. Below this concentration, there was no cell death, suggesting that this is the threshold of YM not to turn somehow toxic.

The effect of YM on the treatment of RAW macrophages at concentrations of 10, 20 and 100 µg / mL induced higher up-regulation effects of gene expression and protein levels of pro-inflammatory cytokines, corroborating previous data whose studies were performed with

non-aqueous extracts in which their ability to regulate the expression of genes related to inflammatory metabolism had already been demonstrated (Arçari et al. 2011; Puangpraphant et al. 2013; Schinella et al. 2014). However, concentrations of 20 and 100 µg / mL also induced a decrease in cell proliferation after 72 hours of treatment and induction of caspase pathways, although the concentration of 100 µg / mL had induced cytotoxicity in the initial test it is still in the threshold described in previous studies.

This anti-inflammatory effect is also found in other beverages and foods such as green tea, red wine and cocoa, studies show that this effect is due to a compound that is present in these drinks and fruit that is the Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Wilasrusmee et al. 2002; Becker et al. 2013). This is responsible for 50 to 80% of the total catechins present in green tea and any effect found is attributed to this compound (Wu et al. 2009; Saleh et al. 2014).

In addition, another potential candidate to consider the anti-inflammatory effect of YM is caffeic acid, which is the main molecule found in plasma after consumption, as described by Oliveira in a study which is not published (Muñoz-Cullaet al. 2016). Some studies have analyzed the effect of the entire YM extract as well as its bioactive compounds alone, concluding that the bioactive compounds are capable of producing the same effect as the whole extract, however a higher concentration of them is needed. This suggests that a synergistic effect between different phenolic compounds occurs (Puangpraphant and De Mejia 2009; Kang et al. 2012). Therefore, this study is interesting because it evaluates the anti-inflammatory capacity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* in macrophages which have no studies.

A study by Souza et al. (2015) states that extracts of *Ilex paraguariensis* showed a potential anti-inflammatory effect, with a significant decrease in nitric oxide production even in the presence of low concentration extracts. Several studies have also reported a protective role of YM in central and peripheral inflammatory pathways (TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-10) (Arçari et al. 2013; Pimentel et al. 2013). Puangpraphant et al. (2011) in their study concluded that

bioactive compounds present in YM may be potential anticancer agents and may attenuate other diseases also associated with inflammation.

In summary, we emphasize here that this is the first work that demonstrate anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Ilex Paraguariensis* in an *in vitro* model of inflammation. Despite the methodological limitations inherent in *in vitro* tests, our objective was to evaluate the effect of the aqueous extract of *Ilex Paraguariensis* independently on genetic and lifestyle interferences. Against this background, the anti-inflammatory effect of the aqueous extract seems to be effective and independent of environmental variables, however dependent on the concentrations of the extract. In this sense, *Ilex Paraguariensis*, in low concentrations, seems to present an anti-inflammatory effect and to be considered a candidate plant for the prevention and treatment of neurodegenerative and metabolic diseases associated with inflammatory and oxidative processes.

## REFERENCES

Arçari, D. P., Santos, J. C., Gambero, A., Ferraz, L. F., and Ribeiro, M. L. 2013. Modulatory effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on the PI3K-AKT signaling pathway. *Mol Nutr Food Res.* **57**(10):1882–1885. doi: 10.1002/mnfr.201200834.

Arçari, D. P., Bartchewsky, W. Jr., Dos Santos, T.W., Oliveira, K.A., De Oliveira, C.C., Gotardo, É.M., et al. 2011. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol.* **335**(2): 110-115. doi: 10.1016/j.mce.2011.01.003.

Arçari, D. P., Bartchewsky, W., Dos Santos, T.W., Oliveira, K. A., Funck, A., Pedrazzoli, J., et al. 2009. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring)*.**17**(12): 2127-2133. doi: 10.1038/oby.2009.158.

Barbisan, F., Azzolin, V. F., Ribeiro, E. E., Duarte, M.M.M.F., and Da Cruz, I.B.M. 2017. The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence. *Rejuvenation Res.* **20**(4): 334-345. doi: 10.1089/rej.2016.1892.

Bastos, D.H.M., De Oliveira, D.M., Matsumoto, R.L.T., Carvalho, P.O., and Ribeiro, M.L. 2007. Yerba maté: Pharmacological properties, research and biotechnology. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol.* **1**(1): 37–46. Available from [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/MAPSB\\_1\(1\)/MAPSB\\_1\(1\)37-46o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/MAPSB_1(1)/MAPSB_1(1)37-46o.pdf) [accessed 02 march 2018].

Becker, K., Geisler, S., Ueberall, F., Fuchs, D., and Gostner, J.M. 2013. Immunomodulatory properties of cacao extracts - potential consequences for medical applications. *Front Pharmacol.* **4**(1):154. doi: 10.3389/fphar.2013.00154.

Berté, K.A., Beux, M.R., Spada, P.K., Salvador, M., and Hoffmann-Ribani, R. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. *J Agric Food Chem.* **59**(10): 5523-5527. doi: 10.1021/jf2008343.

Berto, M.D., Bica, C.G., De Sá, G.P., Barbisan, F., Azzolin, V.F., Rogalski, F., et al. 2015. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis. *Med Oncol.* **32**(11):251. doi: 10.1007/s12032-015-0700-1.

Borges, M.C., Vinolo, M.A., Nakajima, K., De Castro, I.A., Bastos, D.H., Borelli, P., et al. 2013. The effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on metabolic and inflammatory parameters in high-fat diet-fed Wistar rats. *Int J Food Sci Nutr.* **64**(5): 561-569. doi: 10.3109/09637486.2012.759188.

Bracesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., and Gugliucci, A. 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J Ethnopharmacol.* **136**(3):378-384. doi: 10.1016/j.jep.2010.06.032.

Da Cruz Jung, I.E., Machado, A.K., Da Cruz, I.B., Barbisan, F., Azzolin, V.F., Duarte, T., et al. 2016. Haloperidol and Risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. *Psychopharmacology (Berl).* **233**(9):1715-1723. doi: 10.1007/s00213-015-4079-7.

Gambero, A., and Ribeiro, M.L. 2015. The Positive Effects of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) in Obesity. *Nutrients.* **7**(2):730–750. doi: 10.3390/nu7020730.

Gao, H., Liu, Z., Wan, W., Qu, X., and Chen, M. 2013. Aqueous extract of Yerba Mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. *Phytother Res.* **27**(8):1225-1231. doi: 10.1002/ptr.4856.

Gugliucci, A., and Menini, T. 2002. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sci.* **72**(3):279-292. doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02242-7.

Gugliucci, A. 1996. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* **224**(2):338-344. doi.org/10.1006/bbrc.1996.1030.

Gugliucci, A., and Stahl, A.J. 1995. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Mol Biol Int.* **35**(1):47-56. PMID: 7735139.

Heck, C.I., and De Mejia, E.G. 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*), a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* **72**(9):138–151. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.

Kang, G.J., Kang, N.J., Han, S.C., Koo, D.H., Kang, H.K., Yoo, B.S., et al. 2012. The Chloroform Fraction of *Carpinus tschonoskii* Leaves Inhibits the Production of Inflammatory Mediators in HaCaT Keratinocytes and RAW264.7 Macrophages. *Toxicol Res.* **28**(4):255-262. doi: 10.5487/TR.2012.28.4.255.

Laranjinha, J.A., Almeida, L.M., and Madeira, V.M. 1994. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem Pharmacol.* **48**(3):487-494. doi.org/10.1016/0006-2952(94)90278-X.



Machado, D.E., Rodrigues-Baptista, K.C., Alessandra-Perini, J., Soares de Moura, R., Santos, T.A, Pereira, K. G., et al. 2016. Euterpe oleracea Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis. *PLoS One*. **11**(11): e0166059. doi: 10.1371/journal.pone.0166059. eCollection.

Miranda, D.D., Arçari, D.P., Pedrazzoli, J.Jr., Carvalho, P.De.O., Cerutti, S.M., Bastos, D.H., et al. 2008. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*. **23**(4):261-265. doi: 10.1093/mutage/gen011.

Muñoz-Culla, M., Sáenz-Cuesta, M., Guereca-Barandiaran, M.J., Ribeiro, M. L., and Otaegui, D. 2016. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) inhibits lymphocyte activation in vitro. *Food Funct*. **7**(11): 4556-4563. doi: 10.1039/c6fo01061j.

Pimentel, G.D., Lira, F.S., Rosa, J.C., Caris, A.V., Pinheiro, F., Ribeiro, E.B., et al. 2013. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. *J Nutr Biochem*. **24**(5): 809–818. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.04.016.

Puangpraphant, S., Dia, V.P., De Mejia, E.G., Garcia, G., Berhow, M. A., and Wallig, M.A. 2013. Yerba mate tea and mate saponins prevented azoxymethane-induced inflammation of rat colon through suppression of NF- $\kappa$ B p65ser(311) signaling via I $\kappa$ B- $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  reduced phosphorylation. *Biofactors*. **39**(4):430-440. doi: 10.1002/biof.1083.

Puangpraphant, S.; Berhow, M. A.; Vermillion, K.; Potts, G.; and Gonzalez De Mejia, E. 2011. DicaFFEoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- $\kappa$ B nucleus

translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. **55**(10): 1509-1522. doi: 10.1002/mnfr.201100128.

Ramirez-Mares, M.V., Chandra, S., and De Mejia, E.G. 2004. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisiacompressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research*. **554**(1-2):53–65. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.03.002.

Saleh, F., Raghupathy, R., Asfar, S., Oteifa, M., and Al-Saleh, N. 2014. Analysis of the effect of the active compound of green tea (EGCG) on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells. *BMC Complement Altern Med*. **14**(1):322. doi: 10.1186/1472-6882-14-322.

Schinella, G., Neyret, E., Cónsole, G., Tournier, H., Prieto, J.M., Ríos, J.L., et al. 2014. An aqueous extract of *Ilex paraguariensis* reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. *Planta Med*. **80**(12):961-968. doi: 10.1055/s-0034-1382876.

Schinella, G.R., Troiani, G., Dávila, V., De Buschiazzo, P.M., and Tournier, H.A. 2000. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. **269**(2):357-60. doi: 10.1006/bbrc.2000.2293.

Souza, A.H.P., Corrêa, R.C.G., Barros, L., Calhelha, R.C., Santos-Buelga, C., Peralta, R.M., et al. 2015. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. *Food Res Int*. **78**(1):286-294. doi: 10.1016/j.foodres.2015.09.032.

Vinson, J.A., and Dabbagh, Y.A. 1998. Effect of green and black tea supplementation on lipids, lipid oxidation and fibrinogen in the hamster: mechanisms for the epidemiological benefits of tea drinking. *FEBS Lett.* 433(1-2):44-46. doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00880-1.

Wilasrusmee, C., Siddiqui, J., Bruch, D., Wilasrusmee, S., Kittur, S., and Kittur, D.S. 2002. In vitro immunomodulatory effects of herbal products. *Am Surg.* 68(10):860-864. PMID: 12412711.

Wu, D., Guo, Z., Ren, Z., Guo, W., and Meydani, S.N. 2009. Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. *Free Radic Biol Med.* 47(5):636–643. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.001.

## 4.3. MANUSCRITO – 3

**NEUROPROTECTIVE EFFECT OF *ILEX PARAGUARIENSIS* IN *IN VITRO* MODEL  
PARKINSON DISEASE<sup>3</sup>**

**Tábada Samantha Marques Rosa<sup>1\*</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>2</sup>, Fernanda Barbisan<sup>3</sup>,  
Moisés Henrique Mastella<sup>3</sup>, Euler E. Ribeiro<sup>4</sup>, Marta Medeiros Frescura Duarte<sup>5</sup>, Aron  
Ferreira da Silveira<sup>1</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>2,3</sup>.**

<sup>1</sup>Postgraduate program of Disorders of Human Communication, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>3</sup>Postgraduate program of Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>4</sup>Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil

<sup>5</sup> Lutheran University of Brazil , Santa Maria- RS, Brazil

\*Corresponding author. Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria -RS, Brazil. ZipCode 97105900. Phone: +55-55-32208163, email: [sa\\_marqs@hotmail.com](mailto:sa_marqs@hotmail.com)

## ABSTRACT

Parkinson's disease is a chronic, progressive and multisystemic neurodegenerative disorder. The *Ilex Paraguariensis* could be a source of bioactive molecules, and have great utility in combating neurodegenerative pathologies related to oxidative stress. the objective of this study was to evaluate the effect of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* on SH-SY5Y dopaminergic neurons exposed to rotenone. The rotenone It acts by selectively inhibiting the activity of the complex I of the electron transport mitochondrial chain, leading to an induction of neuronal apoptosis. Cells were exposed to a concentration-effect curve of *Ilex paraguariensis* and rotenone. In a second experiment, the neuronal cells were exposed to *Ilex paraguariensis* and after 24 hours the rotenone, a DP-like. The were evaluated: cellular viability, oxidative stress indicators, and expression of gene of antioxidant enzymes and apoptosis. rotenone treatments decreased cell viability in a dose-dependent way with a rate of mortality about greater than 50% at the highest concentrations. The flow cytometric analysis revealed a significant increase in the number of apoptotic cells when they were treated with rotenone, in the cells treated with mate grass, no cytotoxicity was observed. when exposure to *Ilex paraguariensis* occurred prior to treatment with rotenone, the tendency to apoptosis is attenuated, indicating a neuroprotective effect. *Ilex paraguariensis* differentially modulated the gene expression of the antioxidant enzymes Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase. The aqueous extract from *Ilex paraguariensis* is a potential neuroprotective compound against damage caused by rotenone in neural-like cells.

**Key Words:** *Ilex paraguariensis*, Parkinson Disease, Oxidative stress, Rotenone, Cell culture conditions, Cellular differentiation, Cellular model, Dopaminergic neuron, Neuroblastoma, SH-SY5Y cell line

## 1 INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive and multisystemic neurodegenerative disorder (Van et al., 2016). Characterized by bradykinesia, tremor, rigidity and postural instability occurring due to the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra compact in the central nervous system (Cannon and Greenamyre, 2011; Dias et al., 2013). It is the second most common neurodegenerative disease in the world, affecting 1-2% of the population over 60 years. The incidence of this condition progressively increases with age. In 2013, 37 million cases of PD were diagnosed worldwide and its development is the result of a combination of environmental, genetic and lifestyle factors. (Rapp et al., 2011; Palacios et al., 2012; Kiebertz and Wunderle, 2013; Berg et al., 2014; Tanner et al., 2014).

Although the etiology of selective loss of dopaminergic neurons is still unknown, increased apoptosis, decreased mitochondrial activity, and increased oxidative stress have been implicated in the pathophysiology of PD (Chinta and Andersen, 2008; Caudle and Zhang, 2009).

Spontaneous degradation of the neurotransmitter dopamine results in the production of radicals such as superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) and reactive quinones, which are potentially toxic to neurons (Asanuma et al., 2004; Bisaglia et al., 2014).

In addition to the increase of reactive oxygen species (ROS), during the physiological aging of the brain, there is a decrease in antioxidant defenses, specifically superoxide dismutase and catalase enzymes, leading to oxidative stress and apoptosis of dopaminergic neurons (Cardoso et al., 2012).

In this context, neuroprotective therapeutic strategies with dietary origin are being increasingly studied (Sunico et al., 2013; Lu et al., 2014; Neuhaus et al., 2014; Schapira et al., 2014). Among the dietary factors associated with neuroprotection, we highlight the compounds with antioxidant properties that can alleviate the deterioration caused by ROS and delay the aging process.

The extract of *Ilex paraguariensis* is an important source of antioxidants such as polyphenols, methylxanthines, saponins and chlorogenic acid (Bracesco et al., 2011).

*Ilex paraguariensis*, or popularly, yerba mate is a very consumed caffeinated beverage in South America, in the form of Chimarrão or mate, an infusion of dry toasted and ground leaves (Bracesco et al., 2011).

Evidence indicates the effect of *Ilex paraguariensis* against ROS and stimulating the antioxidant defenses of the cells (Lima et al., 2014; Colpo et al., 2016), anti-inflammatory effect (Zuin et al., 2005; Schubert et al., 2007), in lipid metabolism decreasing LDL, increasing HDL (Gugliucci, 1996; Gugliucci and Menini, 2002).

Colpo et al. (2007) demonstrated that *Ilex paraguariensis* is able to avoid memory deficits in rats. Canalis et al. (2014) reported that such a plant could be a source of bioactive molecules, and thus have great utility in combating neurodegenerative pathologies related to oxidative stress, because of their redox effects on the brain.

Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* on SH-SY5Y dopaminergic neurons exposed to rotenone. rotenone is a toxin used for the *in vitro* mimicry of PD. It acts by selectively inhibiting the activity of the complex I of the electron transport mitochondrial chain, leading to an induction of neuronal apoptosis (Mao et al., 2007; Pal et al., 2014).

## 2 MATERIALS AND METHODS

Human neuronal cells (SH-SY5Y) were obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC CRL-2266) and cultured under controlled conditions. Cells were exposed to a concentration-effect curve of *Ilex paraguariensis* (1, 5, 10, 20 and 100 µg/mL) and rotenone (1, 5, 10, 40, and 100 µM). In a second experiment, the neuronal cells were exposed to *Ilex paraguariensis* and after 24 hours the rotenone, a DP-like. The treatments were performed in triplicate in three independent experiments. The following parameters were evaluated: cell viability, cellular apoptosis markers, oxidative stress and genotoxicity.

### 2.1 Obtaining the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* and HPLC-DAD

The extract of *Ilex paraguariensis* was obtained by infusing 100 g of powder, dried sample, into 1000 mL of distilled water and deionized for 10 minutes of infusion at a temperature of approximately 90°C and 3 gentle shaking (sometimes 0 , 5 and 10 '). After extraction, the resulting solution was filtered through filter paper n°. 8, placed in amber glass (1.5 L capacity), the vessel protected from light, stored at -8 ° C, and then lyophilized. The extract produced was equivalent to the instant tea and was kept at -20 °C in plastic tubes, sealed with parafilm and protected from light until used in the experiments. To determine the main molecules present in *Ilex paraguariensis* aqueous extract we performed the analysis through high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) using the Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) system (Shimadzu, Kyoto, Japan) as described in Machado et al. (2016).



## 2.2 Cell culture

The neuronal cell line was cultured in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM F12; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany), supplemented with 1% penicillin/streptomycin and amphotericin B (Invitrogen USA). The cells were cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. The cell suspension was placed in each well of a 96-well plate ( $2.5 \times 10^5$  cells/well). The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 24 and 72 hours. After defining the concentrations to be used via the curve concentration-effect, the treatments were carried out with 10 ug / mL aqueous extract of *Ilex paraguariensis* and 40 uM rotenone.

### 2.2.1 Laboratorial analysis

All analyzes involving measurement of absorbance or fluorescence were performed with SpectraMax i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices- *Sunnyvale, CA-USA*).

### 2.2.2 Cell viability

The neuronal cell viability were evaluated by the MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The supernatants of the treatments were removed and the cells were resuspended in phosphate buffer (PBS, pH 7.4). The MTT was dissolved in 5 mg / mL PBS added to a 96-well plate containing the sample treatments and was subsequently incubated for 1 h at 37 °C. Subsequently, the

supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was read at 560 nm.

### **2.2.3 Analyses of the oxidative stress levels**

ROS production was determined using a fluorescent cell-permeating compound called 2–7-dichlorofluoresceindiacetate (DCFDA) (Barbisan et al., 2014). In this assay, DCFDA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidative factors. After the designated treatment period, the neuronal cells was treated with DCFDA (10  $\mu$ M) for 60 min at 37°C. The fluorescence was measured via excitation at 488 nm and emission at 525 nm on a microplate reader (SpectraMax M2e, Molecular Devices, Austria).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured according to the modified method of Jentzsch et al. (1996). All reagents, i.e., 1 $\times$  TBA acid diluent, SDS lysis solution, TBA reagent, and 1 $\times$  BHT solution, were mixed. Each MDA-containing sample and standard was assayed in duplicate. All the reagents and samples were incubated in a water bath at 95°C for 1 h. Next, the samples were cooled and centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and absorbance was read at 532 nm.

Protein carbonylation by the method of Morabito et al. (2004) where damage is measured by determining the formation of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine. The sample was diluted by 1:80 by using Tris-HCl buffer; treated with 200  $\mu$ L DNPH; and incubated in the dark at room temperature for 60 min. Next, 500  $\mu$ L of denaturation buffer (3% SDS), 2000  $\mu$ L of ethanol, and 2000  $\mu$ L of hexane were added to the sample, and the sample was shaken and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. Supernatant obtained was removed, and pellet was resuspended in 1000  $\mu$ L of denaturation buffer and was

incubated in a water bath (40°C–50°C) for 20 min until it dissolved completely. Next, 100 µL of each sample was transferred to a 96-well plate in triplicate, and absorbance was read at 370 nm.

Superoxide levels were quantified by performing an assay that produced formazan salt through a reaction between nitroblue tetrazolium (NBT) chloride and superoxide (Morabito et al., 2010). Briefly, the cells were seeded in a 96-well plate, treated with 10 µL of NBT solution (10 mg/mL) diluted in 1× PBS, homogenized, incubated at 37° for 3 h, and centrifuged. Next, 75 µL of supernatant was removed, and the same volume of DMSO was added to each well. After incubation for 20 min at 37°C, 75 µL of cell suspension was transferred to another 96-well plate, and absorbance was measured at 550 nm.

#### **2.2.4 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)**

Total RNA was extracted using Trizol, following the manufacturer's instructions (Ludwing-Biotec, Rio Grande do Sul, Brazil). The concentration of the extracted RNA was measured using a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer 532 nm. The RNA (1 µg/mL) was treated with 0.2 µL DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C for 5 min, followed by heating at 65°C for 10 min. The cDNA was then generated by reverse transcription using 1 µL of Iscript cDNA and 4 µL of Iscript Mix (Bio-Rad Laboratories, California, United States). The reaction consisted of the following steps: heating at 25°C for 5 min, at 42°C for 30 min, and at 85°C for 5 min, followed by incubation at 5°C for 60 min. Real time PCR was performed as previously described by Barbisan et al. (2014) using a QuantiFast SYBR® Green PCR Kit and a Rotor Gene® (Qiagen, Hilden, Germany). The specific sequences of the human primers were: Catalase- Forward: GATAGCCTTCGACCCAAGCA and Reverse ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT, superoxide Dismutase- Forward

GCCCTGGAACCTCACATCAA and Reverse GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT, Glutathione peroxidase Forward: GGTTTTCATCTATGAGGGTGTTC and Reverse GCCTTGGTCTGGCAGAGACT, Caspase 3- Forward TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG and Reverse TACCAGTGCATGGAGAAATGG, Caspase 8- Forward AAGGAGCTGCTCTCCGAATT and Reverse CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT. Beta-actin ( $\beta$ -actin) Forward: TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA and Reverse TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA was the cleaning gene used to normalize the gene expression of all samples tested.

### **2.2.5 Caspase immunoassays**

The analyses of CASP- 8 and 3, were performed using the Quantikine Human Caspase Immunoassay to measure CASP in the cell culture supernatants, according to the manufacturer's instructions. Briefly, all reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed. The assay diluent RD1W was added (50 uL) to each well. Further, 100 uL of standard control for our sample was added per well, after which the well was covered with the adhesive strip and incubated for 1.5 h at room temperature. Each well was aspirated and washed twice for a total of three washes. The antiserum of each molecule analyzed here was added to each well and covered with a new adhesive strip and incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated and 200 uL of substrate solution was added to each well and incubated for 20 min at room temperature. Finally, the 50 uL stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm.

### 2.2.6 DNA damage

DNA damage was determined by 8-deoxyguanosine (8-OHdG) using an ELISA immunoassay kit obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. All levels of these variables were corrected by mg/protein.

### 2.3 Statistical Analysis

All assays were performed in independent experiments in triplicate. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 5 software. Treatment results were compared using one-way ANOVA, followed by Tukey or Dunnet *post-hoc* tests using GraphPad (software GraphPad Prism, version 5.0, 2015). The treatments were compared statistically by analysis of variance followed by Dunnet's post hoc test. Significant differences were considered where the  $p \leq 0.05$ .

## 3 RESULTS

The quantification by HPLC-DAD of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* showed a high concentration of polyphenols, alkaloids and tannins as can be observed in (Table 1).

Table 1 here

The cell viability response of *neuronal-like* SH-SY5Y cells to different concentrations (1, 5, 10, 20 and 100  $\mu\text{G/mL}$ ) of aqueous extract of *Ilex paraguariensis* was analyzed (Figure 1A). No significant difference in cell viability was observed between the concentrations tested.

Initially, the cell response to rotenone treatments at (1.5.10.40. 100  $\mu\text{M}$ ) was also measured to confirm the toxicity of these concentrations. As expected, rotenone treatments decreased cell viability in a dose-dependent way with a rate of mortality about greater than 50% at the highest concentrations (40 and 100  $\mu\text{M}$ ) (Figure 1B).

The flow cytometric analysis revealed a significant increase in the number of apoptotic cells when they were treated with rotenone, in the cells treated with mate grass, no cytotoxicity was observed, being those similar to the control, when they were associated, the partial reversal of toxicity caused by rotenone (Figura 1C)

Figure 1 here

To confirm the results of cell viability. Was analysed effect of treatment with aqueous extract of *Ilex paraguariensis* on apoptosis of SH-SY5Y neuronal lineage was assessed by analyzing the gene expression and protein levels of Caspases 8 and 3. The results presented in (Figure 2 A e B) show increased levels of CASP8 and 3 in cells exposed to 40  $\mu\text{M}$  rotenone. However, when exposure to *Ilex paraguariensis* occurred prior to treatment with rotenone, the tendency to apoptosis is attenuated, indicating a neuroprotective effect.

Figure 2 here

Cells previously supplemented with *Ilex paraguariensis* showed a significant decrease in the oxidative stress variables analyzed here in 72 hours: intracellular ROS, lipoperoxidation, protein levels of carbonylation and superoxide (Figure 3).

Figure 3 here

The DNA index of cell damage who received previous supplementation with *Ilex paraguariensis* was also lower than in the treatment exclusively with Rotenone (Figure 4A).

*Ilex paraguariensis* differentially modulated the gene expression of the antioxidant enzymes Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX). The gene expression of the antioxidant enzymes had a very similar behavior. In relation to the untreated control cells, there was a significant increase in the presence of *Ilex paraguariensis*, a significant decrease in the presence of rotenone, and in cells previously treated with aqueous extract and after 24 hours rotenone, there was an increase in the gene expression of the enzymes to levels similar to the cells untreated. SOD had the least intense increase, followed by CAT and GPX (Figure 4B).

Figure 4 here

#### **4 DISCUSSION**

The present study evaluated the neuroprotective effect of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against the neurotoxicity induced by rotenone in neural-like cells SH-SY5Y. Treatment with rotenone is used for the in vitro mimicry of PD. Neuronal cells were treated 24

hours earlier with the *Ilex paraguariensis* and soon after treated with rotenone. The following analyzes were observed: viability, cellular apoptosis and oxidative metabolism.

With this we observed in our results that the *Ilex paraguariensis* reverses damages caused by the rotenone, being these oxidativos or on the cellular apoptosis. The yerba-mate has some properties already describe as: antioxidant (Colpo et al., 2017), anti-inflammatory (Zuin et al., 2005; Schubert et al., 2007), in lipid metabolism, (Gugliucci, 1996; Gugliucci and Menini, 2002) and anti-mutagenic (Miranda et al., 2008; Bracesco et al., 2011).

Our study demonstrated that *Ilex paraguariensis* did not cause a cytotoxic effect on SH-SY5Y cells. According to Colpo et al. (2017) the *Ilex paraguariensis* extract and its main compounds, like chlorogenic acid, exert protective effects against the formation of ROS. Thus, *Ilex paraguariensis* has an antioxidant effect on neuronal cells, reducing oxidative stress.

The control of oxidative stress in neurodegenerative diseases has been the subject of intense studies today. Much evidence suggests that cell aging and progressive neurodegeneration processes are associated with oxidative stress. Although the definitive cause for the loss of substantia nigra in the dopaminergic neuron remains unknown, oxidative stress is one of the factors associated with the risk of PD (Niranjan, 2014; Ewa and Danuta, 2017).

Brain tissue is very susceptible to oxidative stress due to high oxygen uptake (more than 20% of total inspired oxygen) and their high content of polyunsaturated fatty acids that are particularly vulnerable to the EROS attack, in addition to the non-regenerative nature of neurons (Massaad and Klann, 2011; Chen et al., 2012).

Thus, the present significant increase in the level of TBRAS in the oxidative metabolism of SH-SY5Y cells treated with rotenone could be attributed to the attack of the cell membranes by ROS. However, the cells treated preventively with *Ilex paraguariensis* have reversed this increase, which can be explained by the fact that *Ilex paraguariensis* has a large amount of polyphenols, increasing the activity of peroxidases (Anesini et al., 2006).



We observed in our results about oxidative metabolism also an increase in superoxide levels caused by rotenone, this superoxide can react with a molecule of nitric oxide, forming peroxynitrite, a potent oxidizing and nitrating agent that has the ability to modify proteins, lipids and nucleic acids (Korhonen et al., 2005). In addition, the potent peroxynitrite oxidant can directly oxidize dopamine (Takakura et al., 2003) and lead to dopaminergic damage (Imam et al., 2001). However, when the cells were treated with *Ilex paraguariensis* we observed that this action was reversed.

We also analyzed that the *Ilex paraguariensis* protected neuronal cells from apoptosis caused by rotenone. As well as the DNA damage analyzed by 8-OHdG corroborating with a review study by Heck and De Mejia (2007), which describes that *Ilex paraguariensis* have a protective action against DNA oxidation (Heck and De Mejia, 2007).

In relation to the antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPX), also the *Ilex paraguariensis* increased the expression of these enzymes, proving to be protective against the damages caused by rotenone, is explained by the study of Lima and collaborators (2014) which shows its antioxidant capacity by increasing these enzymes, even if it is elucidated by its chemical matrix having a large quantity of phenolic compounds.

In summary, despite methodological restrictions related to *in vitro* protocols, our results suggest that the aqueous extract from *Ilex paraguariensis* is a potential neuroprotective compound against damage caused by rotenone in *neural-like* cells (SH-SY5Y).

## REFERENCES

Anesini C, Ferraro G, Filip R (2006) Peroxidase like activity of *Ilex paraguariensis*. Food Chem 97:459–464.

Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Ogawa N (2004) Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. *Acta Med Okayama* 58:221-233.

Barbisan F, Motta JDER, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MM, Mostardeiro CP, Unfer TC, Schott KL, Da Cruz IB (2014) Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One* 9:e107299.

Berg D, Postuma RB, Bloem B, Chan P, Dubois B, Gasser T, Goetz CG, Halliday GM, Hardy J, Lang AE, Litvan I, Marek K, Obeso J, Oertel W, Olanow CW, Poewe W, Stern M, Deuschl G (2014) Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. *Mov Disord* 29: 454-462.

Bisaglia M, Filograna R, Beltramini M, Bubacco L (2014) Are dopamine derivatives implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Ageing Res Rev* 13:107-114.

Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A (2011) Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J Ethnopharmacol* 136:378-384.

Canalis AM, Cittadini MC, Albrecht C, Soria EA (2014) In vivo redox effects of *Aspidosperma quebracho-blanco* Schldl., *Lantana grisebachii* Stuck and *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. on blood, thymus and spleen of mice. *Indian J Exp Biol* 52:882-889.

Cannon JR, Greenamyre JT (2011) The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicol Sci* 124: 225-250.

Caudle WM, Zhang J (2009) Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Exp Neurol* 220:230-233.

Cardoso HD, et al (2012) Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids. *Front Hum Neurosci* 6: 249.

Chen H, Zhang Y, Lu X, Qu Z (2012) Comparative studies on the physicochemical and antioxidant properties of different tea extracts. *J Food Sci Technol* 49:356-361.

Chinta SJ, Andersen JK (2008) Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1362-1367.

Colpo AC, Rosa H, Lima ME, Pazzini CE, De Camargo VB, Bassante FE, Puntel R, Ávila DS, Mendez A, Folmer V (2016) Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chem* 15:185-195.

Colpo AC, De Lima ME, Maya-López M, Rosa H, Márquez-Curiel C, Galván-Arzate S, Santamaría A, Folmer V (2017) Compounds from *Ilex paraguariensis* extracts have antioxidant effects in the brains of rats subjected to chronic immobilization stress. *Appl Physiol Nutr Metab* 42:1172-1178.

Colpo G, Trevisol F, Teixeira AM, Fachinetto R, Pereira RP, Athayde ML, Rocha JB, Burger ME (2007) *Ilex paraguariensis* has antioxidant potential and attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and memory dysfunction in rats. *Neurotox Res* 12:171-180.

Dias V, Junn E, Mouradian MM (2013) The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 3: 461-491.

Ewa B, Danuta MS (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J Appl Genet* 58: 321-330.

Gugliucci A (1996) Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 224:338-344.

Gugliucci A, Menini T (2002) The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sci* 72:279-292.

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.

Imam SZ, Ali SF (2001) Aging increases the susceptibility to methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in rats: correlation with peroxynitrite production and hyperthermia. *J Neurochem* 78:952-959.

Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. Free Radic Biol Med 20:251-256.

Kiebertz K, Wunderle KB (2013) Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord* 28:8-13.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:471-479.

Lima NS, Oliveira E, Silva APS, Maia LA, Moura EG, Lisboa PC (2014) Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. *Life Sci* 115:29–35.

Lu X, Kim-Han JS, Harmon S, Sakiyama-Elbert S, O'malley KL (2014) The Parkinsonian mimetic, 6-OHDA, impairs axonal transport in dopaminergic axons. *Mol Neurodegener* 9:1-17.

Machado DE, Rodrigues-Baptista KC, Alessandra-Perini J, Soares de Moura R, Dos Santos TA, Pereira KG, Da Silva MY, Souza CJP, Nasciutti EL, Perini AJ (2016) Euterpe oleracea Extract (Açaí) Is a Promising Novel Pharmacological Therapeutic Treatment for Experimental Endometriosis. *PLoS One* 11:e0166059.

Mao YR, Jiang L, Duan YL, AN LJ, Jiang B (2007) Efficacy of catalpol as protectant against oxidative stress and mitochondrial dysfunction on rotenone-induced toxicity in mice brain. *Environ Toxicol Pharmacol* 23:314–318.

Massaad CA, Klann E (2011) Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 14:2013-2054.

Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli JJr, Carvalho PDeO, Cerutti SM, Bastos DH, Ribeiro ML (2008) Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis* 23: 261–265.

Morabito F, Cristani M, Saija A, Stelitano C, Callea V, Tomaino A, Minciullo PL, Gangemi S (2004) Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediators Inflamm* 13: 381-383.

Morabito C, Rovetta F, Bizzarri M, Mazzoleni G, Fanò G, Mariggiò MA (2010) Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radic Biol Med* 48:579-589.

Neuhaus JF, Baris OR, Hess S, Moser N, Schroder H, Chinta SJ, Andersen JK, Kloppenburg P, Wiesner RJ (2014) Catecholamine metabolism drives generation of mitochondrial DNA deletions in dopaminergic neurons. *Brain* 137:354–365.

Niranjan R (2014) The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Mol Neurobiol* 49:28- 38.

Pal R, Monroe TO, Palmieri M, Sardiello M, Rodney GG (2014) Rotenone induces neurotoxicity through Rac1-dependent activation of NADPH oxidase in SHSY-5Y cells. *FEBS Lett* 588:472–481.

Palacios N, Gao X, Mc Cullough ML, Schwarzschild MA, Shah R, Gapstur S, Ascherio A (2012) Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Mov Disord* 27:1276-1282.

Rapp T, Grand A, Cantet C, Andrieu S, Coley N, Portet F, Vellas B (2011) Public financial support receipt and non-medical resource utilization in Alzheimer's disease results from the PLASA study. *Soc Sci Med* 72:1310-1316.

Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JT, Bezdard E (2014) Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet* 384: 545–555.

Schubert A, Pereira DF, Zanin FF, Alves SH, Beck RC, Athayde ML (2007) Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharmazie* 62:876–880.

Sunico CR, Nakamura T, Rockenstein E, Mante M, Adame A, Chan SF, Newmeyer TF, Masliah E, Nakanishi N, Lipton SA (2013) S-Nitrosylation of parkin as a novel regulator of p53-mediated neuronal cell death in sporadic Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 8:29.

Takakura K, Xiaohong W, Takeuchi K, Fukuda S (2003) Peroxynitrite decreases dopamine's vasoconstrictive activity. *Anesth Analg* 97:1492-1496.

Tanner CM, Meng CC, Ravina B, Lang A, Kurlan R, Marek K, Oakes D, Seibyl J, Flagg E, Gauger L, Guest DD, Goetz CG, Kieburtz K, DiEuliis D, Fahn S, Elliott RA, Shoulson I (2014) A practical approach to remote longitudinal follow-up of Parkinson's disease: the FOUND study. *Mov Disord* 29:743-749.

Van Den Heuvel MRC, Daffertshofer A, Beek PJ, Kwakkel G, Van Wegen EEH (2016) The effects of visual feedback during a rhythmic weight-shifting task in patients with Parkinson's disease. *Gait Posture* 48:140-145.

Zuin VG, Montero L, Bauer C, Popp P (2005) Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *J Chromatogr* 1091:2–10.

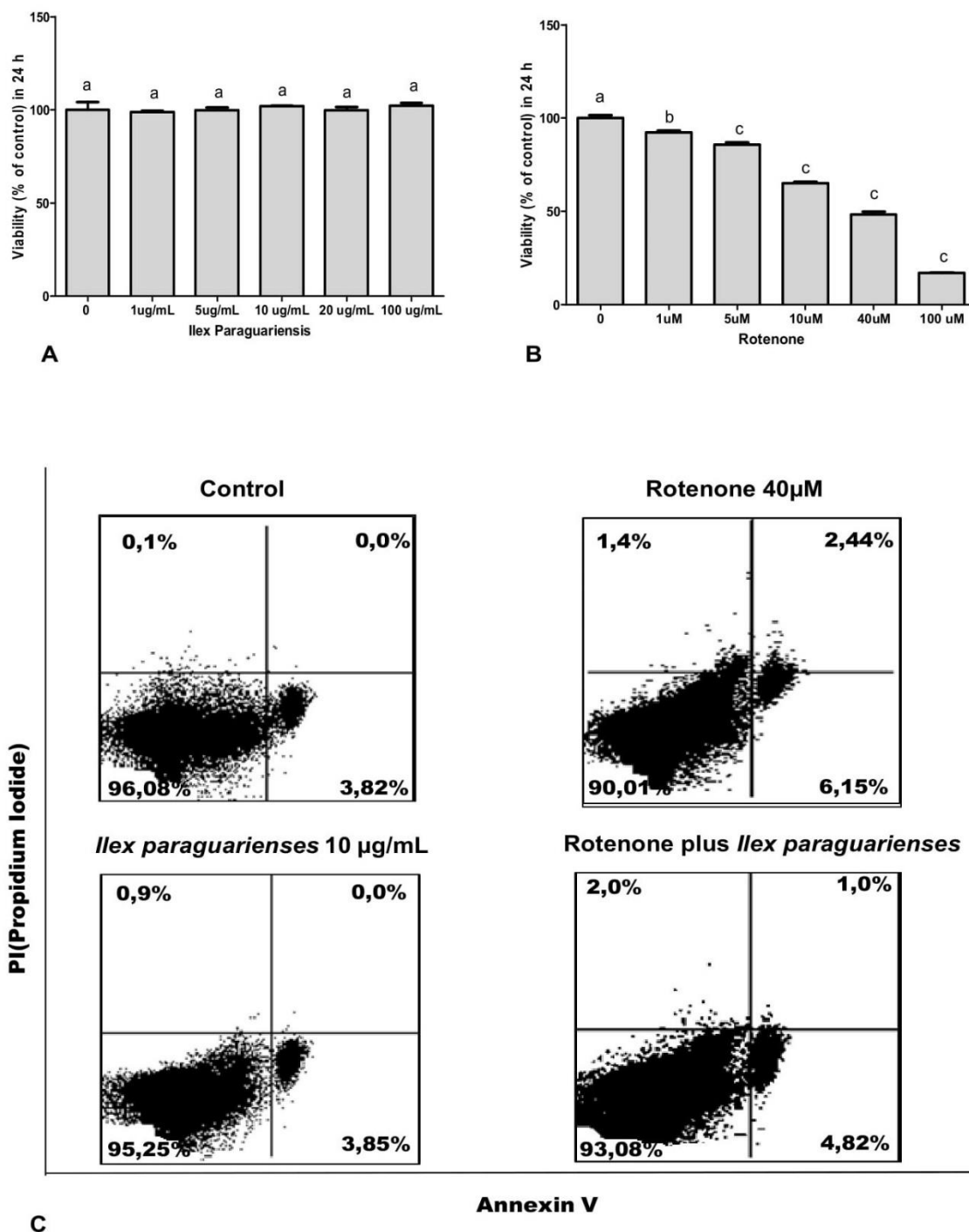


**Table 1:** Bioactive compounds concentration of hot-aqueous extract *Ilex paraguariensis*

<b>Compounds</b>	<b>Yerba mate</b>
Total polyphenols	510.9 ± 42.2
Alkaloids	128.6 ± 1.0
Tannins hydrolysed	770.9 ± 71.2
Tannins condensed	15.9 ± 4.2
Caffeine (extract µg/0.002 g)	89.9 ± 3.4
Caffeine (dry weight/ mg.100 g <sup>-1</sup> )	533.1 ± 23.3
Theobromine (extract µg/0.002 g)	19.9 ± 3.1
Theobromine (dry weight mg.100 g <sup>-1</sup> )	113.8 ± 14.0

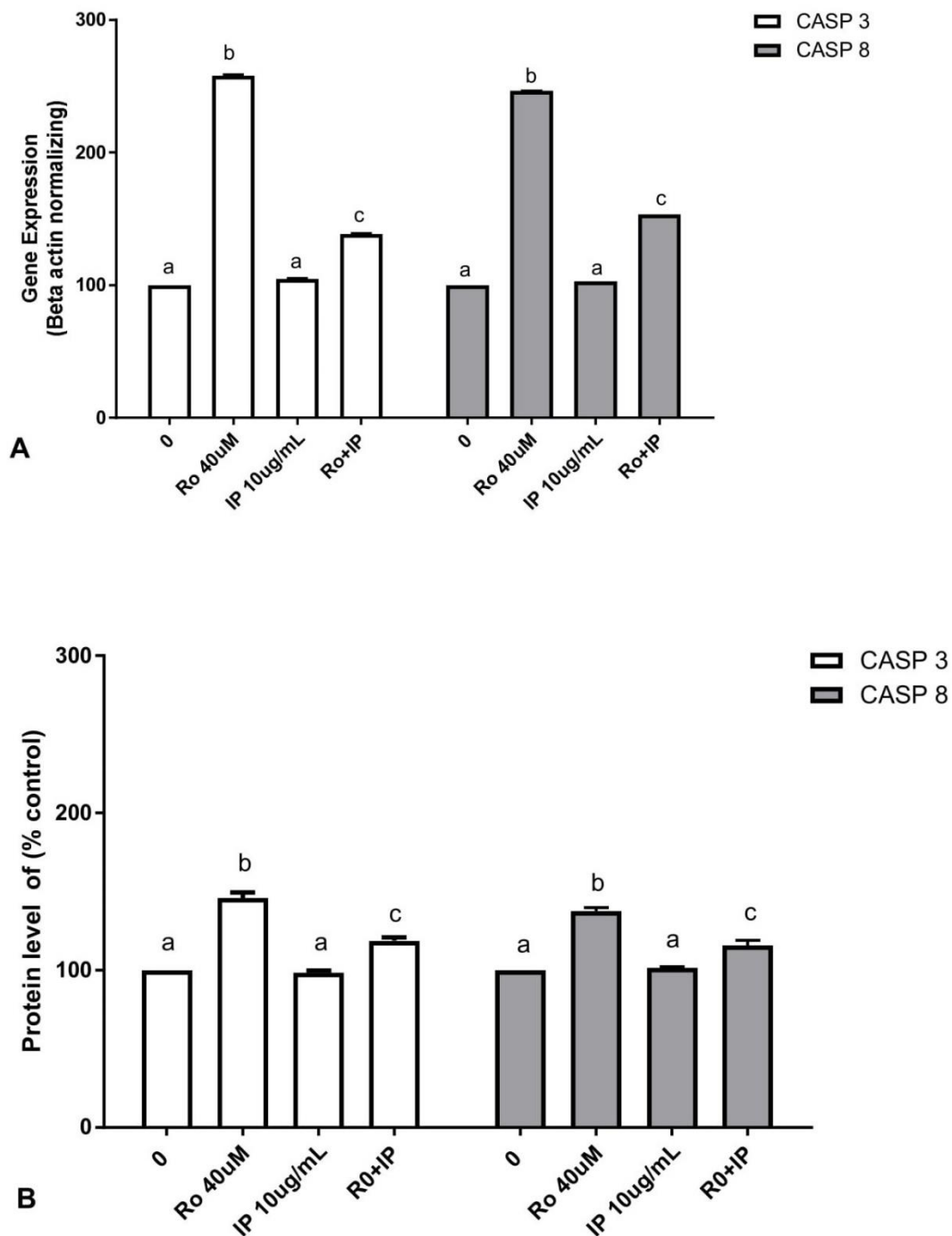
Caffeine; theobromine and total catechin were quantified by HPLC; Data are present as mean ± SD.

FIGURE 1



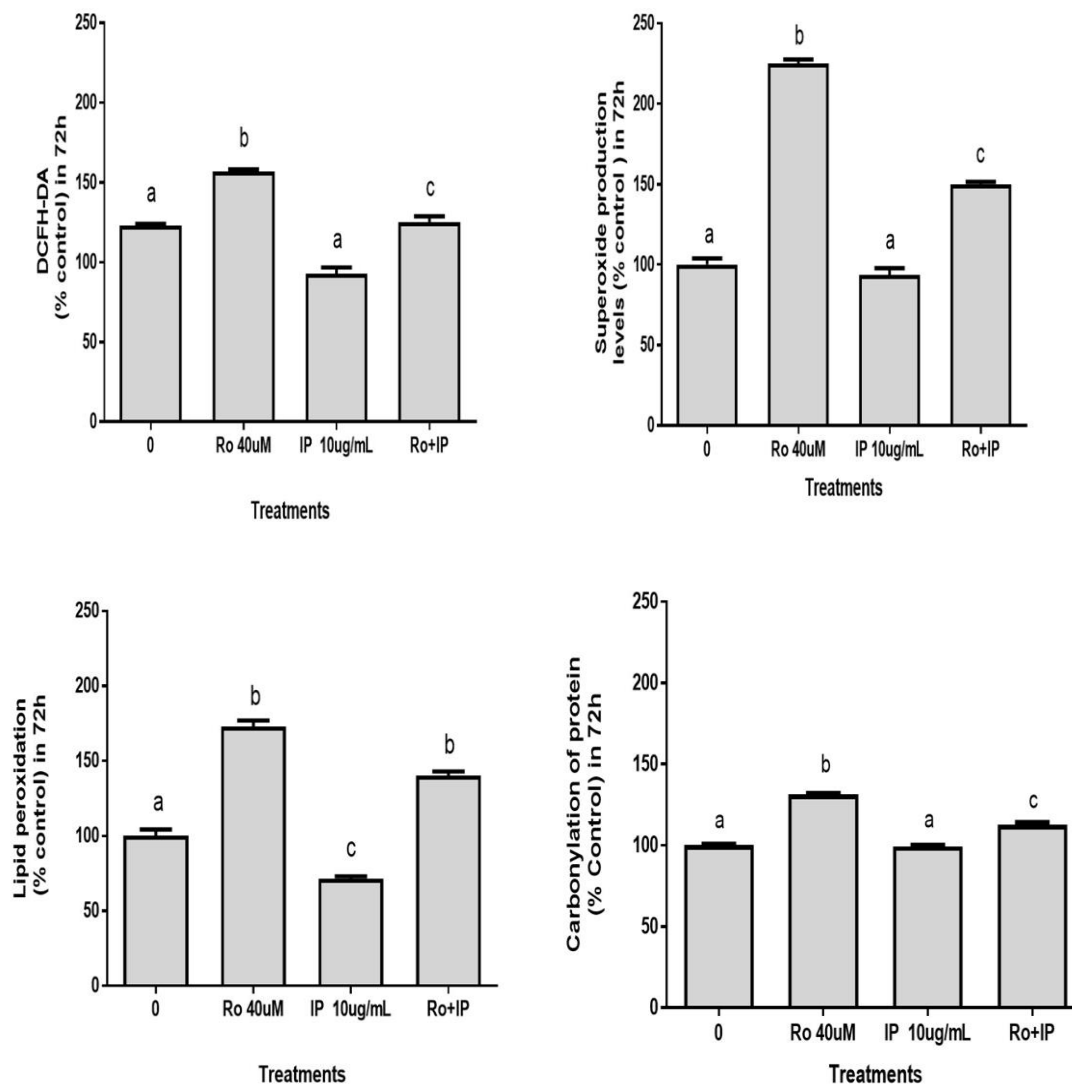
**Figure 1:** Cell viability analysis. (A) SH-SY5Y cells exposed to different concentrations of *Ilex paraguariensis* (0,1,5,10,20,100 µg/mL). (B) SH-SY5Y cells exposed to different concentrations rotenone (1,5,10,40,100 µM) for 24 hours. (C) Analysis of cell viability/ citotoxicity SH-SY5Y cells exposed to better concentration of *Ilex paraguariensis* (10µg / mL) and rotenone (40µM) and association in 24 hours by flow cytometry. The results were considered statistically significant for  $p \leq 0.05$ .

FIGURE 2



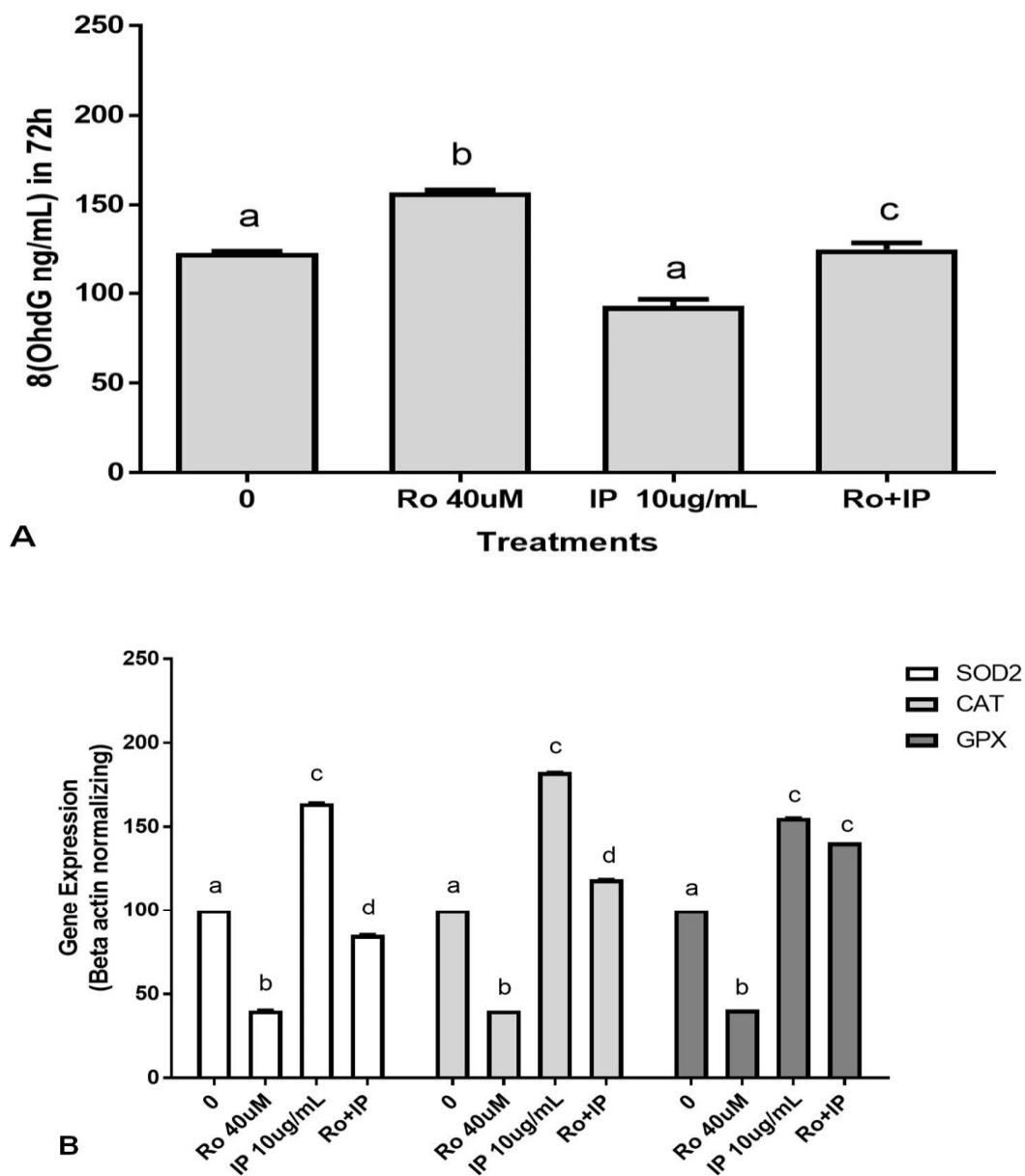
**Figure 2:** Analysis of cellular apoptosis via caspase 3 and 8 gene expression, SH-SY5Y cells exposed to better concentration of *Ilex paraguariensis* (10 $\mu$ g/mL) and rotenone (40 $\mu$ M) and association. (A) Gene expression in 24 hours. (B) Proteins Levels in 72 hours. The results were considered statistically significant for  $p \leq 0.05$ .

FIGURE 3



**Figure 3:** Oxidative Metabolism. SH-SY5Y cells exposed to the best concentrations of *Ilex paraguariensis* (10 $\mu$ g/mL) and rotenone (40 $\mu$ M) and association analyzed in 72 hours of treatment. (A) DCFH-DA, (B) Superoxide Levels (C) TBARS, (D) Carbonylation of Proteins. The results were considered statistically significant for  $p \leq 0.05$ .

FIGURE 4



**Figure 4:** Oxidative metabolism. (A) DNA damage, SH-SY5Y cells exposed to the best concentrations of *Ilex paraguariensis* (10 $\mu$ g / mL) and rotenone (40 $\mu$ M) and association analyzed within 72 hours of treatment. (B) antioxidant enzymes via gene expression analysis, SH-SY5Y cells exposed to better concentrations of *Ilex paraguariensis* (10 $\mu$ g / mL) and rotenone (40 $\mu$ M) and association analyzed in 24 hour treatment. The results were considered statistically significant for the  $p \leq 0.05$ .



## 5. DISCUSSÃO GERAL

Em relação à linhagem celular de macrófagos (RAW 264.7) e às células neuronais (SH-SY5Y) tratadas com extrato de erva-mate, houve, respectivamente, um decréscimo e um aumento na taxa de proliferação celular. Leonard *et al.* (2010) afirmaram que a erva-mate protegeu e reduziu o dano ao DNA, assim como inibiu a peroxidação lipídica induzida pelo  $\text{OH}^-$  em células RAW 264.7. Outro estudo de revisão também sugeriu que a erva-mate pode proteger contra danos no DNA e no reparo (BRACESCO *et al.*, 2011). Isso pode ser explicado, pelo fato de que a erva-mate possui uma alta concentração de componentes polifenólicos, que atuam como antioxidantes, proporcionando uma proteção contra os danos dos radicais livres (ALVAREZ *et al.*, 2002) e um papel importante na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas associadas à idade. Segundo Solanki *et al.* (2016) entre as ações neuroprotetoras dos flavonóides na dieta, pode-se salientar o seu potencial para modular as vias de sinalização celular, proteger os neurônios contra o estresse oxidativo, inibir a NADPH, diminuir a produção de EROs e regular negativamente fatores de transcrição pró-inflamatórios, como a sua capacidade de suprimir a neuroinflamação através da redução da liberação de citocinas.

Em relação à genotoxicidade do extrato aquoso de erva-mate, em geral, não ocorreu em ambas as células (RAW 264.7 e SH-SY5Y), exceto nas maiores concentrações (20 e 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ). Um estudo semelhante, utilizando linfócitos humanos *in vitro*, observou atividade citotóxica do extrato erva-mate nas concentrações mais altas (100 e 1000  $\text{g} / \text{mL}$ ) contra essas células, principalmente devido à cafeína e, portanto, não é exclusiva da erva-mate (ALVES *et al.*, 2008, WNUK *et al.*, 2009). Além disso, nenhum efeito genotóxico da erva-mate (175-1400  $\text{g} / \text{mL}$ ) em linfócitos humanos foi relatado por Alves *et al.* (2008). Tendo em vista, que a citotoxicidade está associada à atividade anticancerígena. A rutina e a quercetina são compostos que mostraram ação citotóxica nas células humanas do câncer de fígado, e embora eles são encontrados em pequenas concentrações na erva-mate, eles integram a diversidade de flavonóides presentes na erva-mate que pode contribuir para o seu potencial efeito anticancerígeno (ALÍA *et al.*, 2006).

Na presente pesquisa, verificou-se que os extratos aquosos de erva-mate em concentrações maiores (20 e 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) causaram um aumento de caspases e a ativação de apoptose em células neurais SH-SY5Y e em macrófagos RAW 264.7. Dados semelhantes, foram encontrados por Ramirez-Mares *et al.* (2016) em que a erva-mate na maior concentração (100  $\mu\text{l}$ ) demonstrou atividade apoptótica significativa contra células tumorais (HaCaT e SCC-

61) com aproximadamente 25 e 32% de células apoptóticas, respectivamente. Puangpraphant *et al.* (2011) demonstraram que os ácidos dicafoilquínicos (grupos de isômeros dos ácidos clorogênicos) presentes nos extratos metanólicos de *Ilex paraguariensis* podem inibir a translocação do núcleo NF-K em macrófagos e induzir a apoptose pela ativação das caspases 8 e 3 em células cancerígenas do cólon humano, o que sugere que os ácidos dicafoilquínicos na erva-mate podem ser potenciais agentes citotóxicos.

Nossos resultados demonstram um forte efeito antiinflamatório do extrato aquoso de erva-mate sobre macrófagos RAW 264.7, porém esse efeito é dependente da concentração, uma vez que as maiores concentrações de 20 e 100 µg / mL aparentemente causaram algum grau de toxicidade nas células. Os resultados corroboram com o estudo de Muñoz-Culla *et al.* (2016), descrevendo a toxicidade *in vitro* da erva-mate em células polimórficas do sangue periférico, no qual na presença de 100 µg / mL, a morte celular aumentou consideravelmente. Abaixo desta concentração, não houve morte celular, sugerindo que este é o limiar de erva-mate para não se tornar de alguma forma tóxica. No estudo de Luz *et al.* (2016) a erva-mate também demonstrou efeito anti-inflamatório em ratos com pleurisia, aumentando a produção de IL-10 e melhorando a arquitetura histológica de pulmões inflamados.

Em um mesmo contexto, um outro estudo foi verificado a citotoxicidade induzida por peroxinitrito (ONOO-) em ratos, macrófagos (RAW 264.7), e células mamárias (31EG4), no qual foi constatado um potente efeito protetor, dependente da dose, da erva-mate, vinho tinto e chá verde. Os resultados demonstraram que quando as preparações fitoterápicas foram preparadas da forma como são geralmente consumidas, a erva-mate apresentou uma maior inibição da nitração protéica e uma alta taxa sobrevivência celular, enquanto o chá verde ou os vinhos tintos apresentaram efeitos significativos, porém menores nas mesmas concentrações (BIXBY *et al.*, 2005). Segundo Bixby *et al.* (2005) a maneira em que o chimarrão é consumido, geralmente implica na extração repetida de uma grande quantidade (50 a 100 g) de produto seco em uma cuia, e o seu consumo intermitente, muitas vezes por horas seguidas, permitiria uma manutenção dos níveis plasmáticos de polifenóis que geralmente não são alcançados com chá verde ou um moderado consumo de vinho tinto.

O efeito da erva-mate no tratamento de macrófagos RAW em concentrações de 10, 20 e 100 µg / mL induziu efeitos de regulação positiva da expressão gênica e níveis protéicos de citocinas pró-inflamatórias, corroborando dados anteriores cujos estudos foram realizados com amostras não aquosas de extratos de erva-mate em que sua capacidade de regular a expressão de genes relacionados ao metabolismo inflamatório já havia sido demonstrada (ARÇARI *et al.* 2011; PUANGPRAPHANT *et al.* 2013; SCHINELLA *et al.* 2014). Ainda no estudo de



Puangpraphant e De Mejia (2009) foi observado um potencial efeito anti-inflamatório do extrato de erva-mate em macrófagos, através do bloqueio da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2). No entanto, as concentrações de 20 e 100 µg / mL também induziram a uma diminuição da proliferação celular após 72 horas de tratamento e a uma indução das vias de caspases, embora a concentração de 100 µg / mL tenha induzido citotoxicidade no teste inicial, ainda está no limiar descrito em estudos anteriores.

Em relação, ao efeito neuroprotetor do extrato aquoso de erva-mate contra a neurotoxicidade induzida pela rotenona em células neuronais SH-SY5Y. Foi constatado, que a erva-mate reverte os danos causados pela rotenona, sendo estes oxidativos ou na apoptose celular. Devido algumas de suas propriedades já descritas como: antioxidante (COLPO *et al.*, 2017), anti-inflamatório (ZUIN *et al.*, 2005; SCHUBERT *et al.*, 2007), no metabolismo lipídico, (GUGLIUCCI, 1996; GUGLIUCCI & MENINI, 2002) e anti-mutagênico (MIRANDA *et al.*, 2008; BRACESCO *et al.*, 2011). Como todas as doenças neurodegenerativas têm ativação da microglia e a neuroinflamação como parte da fisiopatologia da progressão da doença (VILA *et al.*, 2001; LIU & HONG 2003). Assim como, acredita-se que a microglia ativada e a produção de EROS seja a principal fonte de estresse oxidativo que contribui para a morte dos neurônios dopaminérgicos na DP (KOUTSILIERI *et al.*, 2002). Confirmado através de estudos em modelos animais com DP no qual a inibição da ativação da microglia e a produção de fatores pró-inflamatórios no SN reduzem a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos (YANG *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2007). Desta forma, a erva-mate contribui para um efeito neuroprotetor na DP devido suas propriedades supracitadas.

O presente estudo, demonstrou que a erva-mate não causou efeito citotóxico nas células neuronais. Segundo COLPO *et al.* (2017) o extrato de erva-mate e seus principais compostos, como o ácido clorogênico, exercem efeitos protetores contra a formação de EROs. Assim, a erva-mate possui um efeito antioxidante nas células neuronais, reduzindo o estresse oxidativo.

Acredita-se que mudanças na atividade mitocondrial sejam a principal causa da ocorrência de distúrbios neurodegenerativos, pois são os principais produtores de EROs (IMBRIANI *et al.*, 2018). Godoy *et al.* (2017) observaram que a quercetina exibe atividade antioxidante que protege contra a toxicidade neuronal induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, embora essa proteção tenha sido parcial em neurônios do hipocampo de ratos. Os animais tratados com quercetina causaram uma redução nos níveis de EROS, recuperaram a morfologia mitocondrial normal e preveniram a disfunção mitocondrial em neurônios que foram manipulados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GODOY *et al.*, 2017). Assim, o aumento significativo ao nível de TBARs no metabolismo oxidativo de células SH-SY5Y tratadas com rotenona poderia ser atribuído ao ataque das

membranas celulares pelas EROs. Entretanto, as células tratadas preventivamente com erva-mate reverteram esse aumento, o que pode ser explicado, pelo fato da erva-mate ter uma grande quantidade de polifenóis, aumentando a atividade das peroxidases (ANESINI *et al.*, 2006).

Foi verificado, no atual estudo, que o metabolismo oxidativo também aumenta os níveis de superóxido causado pela rotenona, este superóxido pode reagir com uma molécula de óxido nítrico, formando peroxinitrito, um potente agente oxidante e nitrante que tem a capacidade de modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (KORHONEN *et al.*, 2005). Além disso, o potente oxidante de peroxinitrito pode oxidar diretamente a dopamina (TAKAKURA *et al.*, 2003) e levar a danos dopaminérgicos (IMAM *et al.*, 2001). No entanto, quando as células foram tratadas com erva-mate, observamos que essa ação foi revertida.

Também foi analisado, na atual pesquisa, que a erva-mate protege as células neuronais da morte celular causada pela rotenona. Assim como, ao dano no DNA analisado pelo 8-OHdG corroborando com um estudo de revisão de HECK e De MEJIA (2007), que descreve que a erva-mate tem uma ação protetora contra a oxidação do DNA (HECK e DE MEJIA, 2007).

Em relação às enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX), também a erva-mate aumentou a expressão dessas enzimas, mostrando ser protetora contra os danos causados pela rotenona, o que é explicado pelo estudo de Lima e colaboradores (2014) que mostra a sua capacidade antioxidante, aumentando estas enzimas, mesmo que seja elucidado pela sua matriz química tendo uma grande quantidade de compostos fenólicos. Uma outra pesquisa analisou os efeitos da ingestão do chimarrão na expressão das enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica e no estado antioxidante em mulheres jovens saudáveis. Foi constatado que o consumo de chimarrão alterou os parâmetros de estresse oxidativo no plasma, com um aumento nos níveis de leucócitos e na expressão gênica das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPX) após uma semana da ingestão do chimarrão. Os mecanismos exatos por quais estes efeitos são regulados ainda estão por ser investigados. Os resultados do estudo apontam que a ingestão regular de chimarrão pode proteger o organismo contra o estresse oxidativo por múltiplos mecanismos (MATSUMOTO *et al.*, 2009).

## 6. CONCLUSÃO

A revisão de literatura reforça os efeitos benéficos da erva-mate na inflamação, estresse oxidativo e na prevenção de sintomas parkinsonianos.

Os resultados descritos no primeiro manuscrito demonstraram que:

- A atividade mitocondrial, avaliada pelo ensaio MTT, foi diminuída nos macrófagos (RAW 264.7) tratados com extrato de erva-mate em todas as concentrações, exceto 5µg/mL, nas células neuronais (SH-SY5Y) houve um aumento na taxa proliferativa nas concentrações de 1 e 10 µg/mL em relação ao controle;

- A genotoxicidade, estimada pela quantificação dos níveis de 8-OHdG, não ocorreu na exposição ao extrato de erva-mate, com exceção nas maiores concentrações de 20 e 100 µg/mL em ambas as células (RAW 264.7 e SH-SY5Y);

- Na apoptose celular, os macrófagos RAW 264.7 expostos ao extrato de erva-mate foi observado um aumento nos níveis de caspases 1, 3 e 8 nas maiores concentrações (20 e 100 µg/mL), porém nas células neurais SH-SY5Y ocorreu um aumento nas caspases 1 e 8, somente em concentrações mais elevadas, e a caspase 3 aumentou em todos os tratamentos, exceto 1 µg/mL.

Os resultados descritos no segundo manuscrito demonstraram que:

- Somente na concentração mais alta (100 µg/mL) a erva-mate diminuiu a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7, analisado pelo ensaio MTT;

- O tratamento com PHA desencadeou um estado proliferativo e o tratamento com erva-mate induziu uma resposta antiinflamatória nos macrófagos RAW 264.7;

- As maiores concentrações de erva-mate (20 e 100µg/mL) levaram a um aumento significativo nos níveis protéicos das caspases 1,3 e 8 nos macrófagos RAW 264.7;

- O efeito da maturação no tratamento de macrófagos RAW 264.7, através da expressão gênica analisada por qRT-PCR, foi dependente da concentração, sendo que nas maiores concentrações do extrato de erva-mate (10-20-100µg/mL), a reversão da inflamação causada pelo PHA foi mais intensa. Os resultados foram praticamente repetidos em relação aos níveis protéicos dessas citocinas;

- A citocina anti-inflamatória IL-10, nas concentrações de 1 e 5 µg/mL de erva-mate não causaram aumento na expressão do gene, porém nas concentrações de 10, 20 e 100 µg/mL houve uma regulação induzida no gene. E os níveis de proteína, analisados por imunoenensaio, complementam os resultados obtidos na análise da expressão gênica;

Os resultados descritos no terceiro manuscrito demonstraram que:

- Nenhuma diferença significativa na viabilidade celular de células neuronais, através do teste MTT, foi observada entre as concentrações testadas (1, 5, 10, 20 e 100  $\mu\text{G/mL}$ ) de erva-mate;

- Os tratamentos com rotenona diminuíram a viabilidade celular, de um modo dependente da dose, com uma taxa de mortalidade superior a 50% nas maiores concentrações (40 e 100  $\mu\text{M}$ );

- Foi observado níveis aumentados de caspases 8 e 3 em células neuronais expostas a 40  $\mu\text{M}$  de rotenona. Todavia, quando a exposição da erva-mate ocorreu antes do tratamento com rotenona, a tendência à apoptose é diminuída, indicando um efeito neuroprotetor;

- As células neuronais previamente suplementadas com erva-mate mostraram uma diminuição significativa nas variáveis de estresse oxidativo: EROs, lipoperoxidação, níveis protéicos de carbonilação e superóxido;

- A erva-mate modulou diferencialmente a expressão gênica das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPX). Nas células controle, houve um aumento significativo. Na presença de erva-mate, uma diminuição significativa. Na presença de rotenona, e em células previamente tratadas com erva-mate e após 24 horas com rotenona, houve um aumento na expressão do gene das enzimas a níveis semelhantes às células não tratadas;

-A lesão no DNA, analisado pelo teste 8-OHdG, em células neuronais foi menor nas células que receberam suplementação prévia com erva-mate do que no tratamento exclusivo com rotenona.

Apesar das limitações metodológicas inerentes aos estudos *in vitro* os resultados, do presente estudo, podem ser considerados relevantes, como uma alternativa de se utilizar a erva-mate na prevenção da DP. Portanto, mais estudos precisam ser realizados para confirmação da eficácia deste fitoterápico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. v.105, n.1, p.121-126, 1984.
- ABBAOUI, A.; HIBA, O.E.; GAMRANI, H. Neuroprotective potential of Aloe arborescens against copper induced neurobehavioral features of Parkinson's disease in rat. **Acta Histochem**. v. 119, n. 5, p. 592-601, 2017.
- ALÍA, M.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; GRANADO-SERRANO, A. B.; BRAVO, L.; GOYA, L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 212, n. 1, p. 110–118, 2006.
- ALVAREZ, S.; ZAOBORNÝ, T.; ACTIS-GORETTA, L.; FRAGA, C. G.; BOVERIS, A. 2002. Polyphenols and red wine as peroxynitrite scavengers: a chemiluminescent assay. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 957, n. 1, p. 271–273, 2002.
- ALVES, R.J.; JOTZ, G.P.; DO AMARAL, V. S.; MONTES, T. M.; MENEZES, H.S.; DE ANDRADE, H. H. The evaluation of mate (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. **Toxicol in Vitro**.v. 22, n. 3, p. 695–698, 2008.
- ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. v. 14, n. 3, p. 243-250, 2001.
- ARAUJO, S.M.; PAULA, M.T.; POETINI, M.R.; MEICHTRY, L.; BORTOLOTTI, VC.; ZARZECKI, M.S.; JESSE, C.R.; PRIGOL, M. Effectiveness of rmgamma-oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone, **Neurotoxicology**. v. 51, n. 1, p. 51-96, 2015.
- ARÇARI, D.P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T.W.; OLIVEIRA, K.A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M.F.; SAAD, M.J.; BASTOS, D.H.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P.O.;RIBEIRO, M.L. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**. v. 17, n. 12, p. 2127–2133, 2009.
- ASANUMA, M.; MIYAZAKI, I.; DIAZ-CORRALES, F.J.; OGAWA, N. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced Parkinsonism. **Acta Medica Okayama**, v. 58, n.5, p. 221-233, 2004.
- AYOUBI, F.; SHAMSIZADEH, A.; FATEMI, I.; VAKILIAN, A.; ALLAHTAVAKOLI, M.; HASSANSHAHI, G.; MOGHADAM-AHMADI, A. Bio-effectiveness of the main flavonoids of *Achillea millefolium* in the pathophysiology of neurodegenerative disorders- a review. **Iran J Basic Med Sci**. v. 20, n. 6, p. 604-612, 2017.

AZEVEDO, L. L.; CARDOSO, F.; REIS, C. Análise acústica da prosódia em mulheres com doença de Parkinson: comparação com controles normais. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. v. 61, n. 4, p. 999-1003, 2003.

AZZOLIN, V.F.; CADONA, F.C.; MACHADO, A.K.; BERTO, M.D.; BARBISAN, F.; DORNELLES, E.B.; GLANZNER, W.G.; GONÇALVES, P.B.; BICA, C.G.; DA CRUZ, I.B. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. **Toxicol In Vitro**. v. 32, n. 1, p.8-15, 2016.

BASTOS, D.H.M.; OLIVEIRA, D.M.; MATSUMOTO, R.L.T.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**. v. 1, n. 1, p.37-46, 2007.

BEAL, M. F.; *et al.* A randomized clinical trial of high-dosage coenzyme Q10 in early Parkinson disease: no evidence of benefit. **JAMA Neurol**. v. 71, n. 5, p. 543-552, 2014.

BENKLER, M.; AGMON-LEVIN, N.; HASSIN-BAER, S.; COHEN, O.S.; ORTEGA-HERNANDEZ, O.D.; LEVY, A.; MOSCAVITCH, S.D.; SZYPER-KRAVITZ, M.; BOWER, J.H.; MARAGANORE, D.M.; PETERSON, B.J.; AHLKOG, J.E.; ROCCA, W.A. Immunologic diseases, anti-inflammatory drugs, and Parkinson disease: a case-control study. **Neurology**. v. 67, n. 3, p. 494-496, 2006.

BERRIOS, G. E. Introdução à “Paralisia agitante” de James Parkinson (1817). **Revs. Latnoam. Psicopat. Fund**. v. 19, n. 1, p. 114-121, 2016.

BISAGLIA, M.; FILOGRANA, R.; BELTRAMINI, M.; BUBACCO, L. Are dopamine derivatives implicated in the pathogenesis of Parkinson’s disease? **Ageing Res Rev**. v. 13, n. 1, p. 107-114, 2014.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci**. v. 77, n. 3, p. 345-358, 2005.

BOAVENTURA, B. C. B.; AMBONI, R. D. M. C.; DA SILVA, E. L.; PRUDENCIO, E. S.; PIETRO, P. F. D.; MALTA, L. G.; POLINATI, R. M.; LIU, R. H. Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**. v. 77, n. 2, p. 257-263, 2015.

BOSTANTJOPOULOU, S.; KATSAROU, Z.; KARAKASIS, C, et al. Evaluation of non-motor symptoms in Parkinson’s Disease: An underestimated necessity. **Hippokratia**. v. 17, n. 1, p. 214-219, 2013.

BURRÉ, F.; SHARMA, M.; TSETENIS, T.; BUCHMAN, V.; ETHELTON, M.R.; SUDHOF, T.C. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. **Science**. v. 329, n. 5999, p. 1663-1667, 2010.

BRACESCO, N. **Exploracion del efecto protector frente a radicales libres de los derivados de la uva (*Vitis vinifera* Cv.Tannat) y de la infusion de yerba mate(*Ilex paraguariensis*)**

en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay, 2003.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011.

BYSTROM, L.M.; GUZMAN, M.L.; RIVELLA, S. Iron and Reactive Oxygen Species: Friends or Foes of Cancer Cells? **Antioxid Redox Signal**. v. 20, n. 12, p. 1917-1924, 2014.

CARDOSO, H.D.; *et al.* Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids. **Frontiers in Human Neuroscience**. v.6, n. 1, p. 249, 2012.

CAPPELLETTI, S.; PIACENTINO, D.; SANI, G.; AROMATARIO, M. Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? **Curr. Neuropharmacol**. v. 13, n. 1, p. 71–88, 2015.

CATALGOL, B. K.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 8, p.1538-1544, 2007.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 29, n. 3-4, p. 323-333, 2000.

CHASTAN, N.; DO, M.C.; BONNEVILLE, F.; TORNAY, F.; BLOCH, F.; WESTBY, G.W.; DORMONT, D.; AGID, Y.; WELTER, M.L. Gait and balance disorders in Parkinson's disease: impaired active braking of fall of centre of gravity. **Movement Disorders**. v. 24, n. 2, p. 188-195, 2009.

CHAUDHURI, K. R.; SAUERBIER, A.; ROJO, J. M, *et al.* The burden of non-motor symptoms in Parkinson's disease using a self-completed non-motor questionnaire: a simple grading system. **Parkinsonism Relat Disord**. v. 21, n. 1, p. 287–291, 2015.

CHEN, H.; ZHANG, S.M.; HERNÁN, M.A.; SCHWARZSCHILD, M.A.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; ASCHERIO, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. **Archives of Neurology**. v. 60, n. 8, p. 1059–1064, 2003.

CHRISTOFOLETTI G, FREITAS, R.T.; CÂNDIDO, E.R.; CARDOSO, C.S.; Eficácia de tratamento fisioterapêutico no equilíbrio estático e dinâmico de pacientes com Doença de Parkinson. **Fisioterapia e Pesquisa**. v. 17, n. 3, p. 259-263, 2010.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79, n. 1, p. 362–372, 1999.

CLIFFORD, M.N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **Planta Med**. v. 70, n. 12, p.1103–1114, 2004.

COLEMAN, M. D.; O'NEIL, J. D.; WOEHLING, E. K.; NDUNGE, O. B. A.; HILL, E. J.; MENACHE, A.; REISS, C. J. A preliminary investigation into the impact of a pesticide

combination on human neuronal and glial cell lines in vitro. **PLoS One**. v. 7, n. 8, p. e42768, 2002.

COSTA, F.; DORNELLES, E.; MÂNICA-CATTANI, M.F.; ALGARVE, T.D.; SOUZA FILHO, O.C.; SAGRILLO, M.R.; GARCIA, L.F.; CRUZ, I. B. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphen citrate in oxidative metabolism. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 24, n. 4, p. 474–481, 2012.

COTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S. Methods of the Antioxidant Defense: A Literature Review. **UNOPAR Ciências Biológicas da Saúde**. v.15, n.3, p. 231-237, 2013.

CRUVINEL, W. M. *et al.* Sistema imunitario: Parte I-Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia** v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DA CRUZ JUNG, I. E.; MACHADO, A. K.; DA CRUZ, I. B.; BARBISAN, F.; AZZOLIN, V. F.; DUARTE, T.; DUARTE, M. M.; DO PRADO-LIMA, P. A.; BOCHI, G. V.; SCOLA, G.; MORESCO, R. N. Haloperidol and risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. **Psychopharmacology**. v. 233, n. 9, p.1715-1723, 2016.

DAMIANOVICH, M.; BLANK, M.; CHAPMAN, J.; SHOENFELD, Y. Immunology, autoimmunity, and autoantibodies in Parkinson's disease. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**. v. 42, n. 2, p.164–71, 2012.

DAVE, S.; KAUR, N. J.; NANDURI, R.; DKHAR, H. K.; KUMAR, A.; GUPTA, P. Inhibition of Adipogenesis and Induction of Apoptosis and Lipolysis by Stem Bromelain in 3T3-L1 Adipocytes. **Plos One**. v. 7, n. 1, p.e30831, 2012.

DE MEJIA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMIREZ-MARES, M. V. 2010. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolic, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**. v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

DE MORAIS, E.C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G.A.; BOAVENTURA, B.C.; DE ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P.F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E.L. 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, n. 18, p. 8316–8324, 2009.

DE STEFANI, E.; CORREA, P.; FIERRO, L.; FONTHAM, E.; CHEN, V.; ZAVALA, D. Black Tobacco, Maté, and Bladder Cancer. A Case-Control Study From Uruguay. **Cancer**. v. 67, n. 2, p. 536–540, 1991.

DE STEFANI, E.; CORREA, P.; OREGGIA, F.; DENEOPELLEGRINI, H.; FERNANDEZ, G.; ZAVALA, D.; CARZOGLIO, J.; LEIVA, J.; FONTHAM, E.; RIVERO, S. Black tobacco, wine and mate in oropharyngeal cancer. A case-control study from Uruguay. **Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique**. v. 36, n. 6, p. 389–394, 1988.



DE STEFANI, E.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P. .Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 12, n. 1, p. 508–513, 2003.

DICKEL, M.L.; RATES, S.M.; RITTER, M.R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 109, n. 1, p. 60-71, 2007.

DUKE, D.C.; MORAN, L.B.; PEARCE, R.K.; GRAEBER, M.B. The medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease: mRNA profiles associated with higher brain tissue vulnerability. **Neurogenetics.** v. 8, n. 2, p. 83–94, 2007.

ELBAZ, A.; CARCAILLON L.; KAB, S.; MOISAN F. Epidemiology of Parkinson's disease. **Rev Neurol (Paris).** v. 172, n. 1, p. 14–26, 2016.

ESTEVEZ, M.; CRISTÓVÃO, A.C.; SARAIVA, T.; ROCHA, S.M.; BALTAZAR, G.; FERREIRA, L.; BERNARDINO, L. Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles induce neuroprotection in a mouse model for Parkinson's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience.** v. 7, n. 20, p. 1-10, 2015.

FARZANEH, V.; CARVALHO, I. S. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. **Industrial Crops and Products.** v. 65, n. 1, p. 247-258, 2015.

FERRI-DE-BARROS, J. E. Como diagnosticar e tratar Doença de Parkinson. Moreira Jr. Editora. v. 12, n. 6, p. 113-118, , 2012.

FILIP.R.; *et al.* **Mate (Ilex paraguariensis).** In: FILIPPO, I (Org.). Recent Advances in Phytochemistry. 2ª Ed. Kerala (India). v. 1, p. 113–131, 2010.

FONSECA, C. A.; OTTO, S. S.; PAUMGARTTEN, F. J.; LEITÃO, A. C. Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrao (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology.** v.19, n. 4, p. 333–346, 2000.

FUJIKAWA, T.; KANADA, N.; SHIMADA, A.; OGATA, M.; SUZUKI, I.; HAYASHI, I.; et al. Effect of sesamin in *Acanthopanax senticosus* HARMS on behavioral dysfunction in rotenone-induced parkinsonian rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** v. 28, n.1, p. 169–172, 2005.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery.** v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016.

FRANK-CANNON, T.C.; TRAN, T.; RUHN, K.A.; MARTINEZ, T.N.; HONG, J.; MARVIN, M.; HARTLEY, M.; TREVIÑO, I.; O'BRIEN, D.E.; CASEY, B.; GOLDBERG, M.S.; TANSEY, M.G. Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. **Journal of Neuroscience.** v. 28, n. 43, p.10825–10834, 2008.

FRIEDMAN, B.; LAHAD, A.; DRESNER, Y.; VINKER, S. Long-term statin use and the risk of Parkinson's disease. **The American Journal of Managed Care.** v. 19, n. 8, p. 626–632, 2013.

GAO, H.M.; KOTZBAUER, P.T.; URYU, K.; LEIGHT, S.; TROJANOWSKI, J.Q.; LEE, V.M. Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. **Journal of Neuroscience**. v. 28, n. 30, p. 7687–7698, 2008.

GAO, X.; CHEN, H.; SCHWARZSCHILD, M.A.; ASCHERIO, A. Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. **American Academy of Neurology Journals**. v. 76, n. 10, p. 863–869, 2011.

GAO, H.M.; ZHOU, H.; HONG, J.S. Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. **Neuroinflammation and neurodegeneration**, p. 81-104, 2014.

GARCIA-PTACEK, S.; KRAMBERGER, M.G. Parkinson Disease and Dementia. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**. v. 29, n. 5, p. 261-270, 2016.

GATTO, E.M.; MELCON, C.; PARISI, V.L.; BARTOLONI, L.; GONZALEZ, C.D. Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case-control study. **Journal of Neuroscience**. v. 356, n. 1-2, p. 163-167, 2015.

GHOBRIL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **A Cancer Journal for Clinicians**. v. 55, n. 1, p. 178–194, 2005.

GIACOPPO, S.; RAJAN, T.S.; DE NICOLA, G.R.; IORI, R.; ROLLIN, P.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. The Isothiocyanate Isolated from *Moringa oleifera* Shows Potent Anti-Inflammatory Activity in the Treatment of Murine Subacute Parkinson's Disease. **Rejuvenation Research**. v. 20, n. 1, p. 50-63, 2017.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**. v. 40, n. 8, p. 959-975, 2001.

GNOATTO, S.C.; *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. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, n. 2, p. 771-782, 2008.

GODOY, J.A.; LINDSAY, C.B.; QUINTANILLA, R.A.; CARVAJAL, F.J.; CERPA, W.; INESTROSA, N.C. Quercetin exerts differential neuroprotective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and A $\beta$  aggregates in hippocampal neurons: the role of mitochondria. **Mol Neurobiol**. v. 54, n. 9, p.7116–7128, 2017.

GOLDMAN, S.M.; TANNER, C.M.; OAKES, D.; BHUDHIKANOK, G.S.; GUPTA, A.; LANGSTON, J.W. Head injury and Parkinson's disease risk in twins. **Annals of Neurology**. v. 60, n. 1, p. 65–72, 2006.

GOLDMAN, J.G.; WEINTRAUB, D. Advances in the treatment of cognitive impairment in Parkinson's disease. **Movement Disorders**. v. 30, n. 11, p. 1471-1489, 2015.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*, induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 224, n. 2, p. 338–344, 1996.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. **Life Sciences**. v. 71, n. 1, p.693–705, 2002.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**. v. 80, n. 2, p.138–142, 2009a.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.; SCHULZE, J.; SOUZA, M.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**. v. 80, n. 6, p. 339–344, 2009b.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs & Aging**. v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? **Free Radical Biology and Medicine**. v. 32, n. 10, p. 968–974, 2002.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**. v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HANCOCK, D.B.; MARTIN, E.R.; STAJICH, J.M.; JEWETT, R.; STACY, M.A.; SCOTT, B.L.; VANCE, J.M.; SCOTT, W.K. Smoking, caffeine, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in families with Parkinson disease. **Archives of Neurology** . v. 64, n. 4, p. 576–580, 2007.

HATZIAGAPIOU, K.; KAKOURI, E.; LAMBROU, G.I.; BETHANIS, K.; TARANTILIS, P.A. Antioxidant Properties of *Crocus Sativus* L. and its Constituents and Relevance to Neurodegenerative Diseases; Focus on Alzheimer's And Parkinson's disease. **Curr Neuropharmacol**. 2018 Mar 20 [Epub ahead of print].

HE, Q.; YU, W.; WU, J.; CHEN, C.; LOU, Z.; ZHANG, Q.; ZHAO, J.; WANG, J.; XIAO, B. Intranasal LPS-mediated Parkinson's model challenges the pathogenesis of nasal cavity and environmental toxins. **PLoS One**. v. 8, n. 11, p. e78418, 2013.

HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*), a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**. v. 72, n. 9, p.138–151, 2007.

HECK CI.; SCHMALKO, M.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, n. 18, p. 8394–8403, 2008.

HERNÁN, M.A.; LOGROSCINO, G.; GARCÍA RODRÍGUEZ, L.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease. **American Academy of Neurology Journals**. v. 66, n. 7, p. 1097–1099, 2006.

HSU, C.K.; LEO, P.; SHASTRY, D.; MEGGS, W.; WEISMAN, R.; HOFFMAN, R.S. Anticholinergic poisoning associated with herbal tea. **Archives of Internal Medicine**. v. 155, n. 20, p. 2245–2248, 1995.

IMBRIANI, P.; SCIAMANNA, G.; SANTORO, M.; SCHIRINZI, T.; PISANI, A. Promising rodent models in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**.v.46, n.1, p. S10–S14, 2018.

JAFARI, M.; RABBANI, A. Studies on the mechanism of caffeine action in alveolar macrophages: caffeine elevates cyclic adenosine monophosphate level and prostaglandin synthesis. **Metabolism**. v. 53, n. 6, p. 687–692, 2004.

JAISWAL, R.; SOVDAT, T.; VIVAN, F.; KUHNERT, N. Profiling and characterization by LC–MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, n. 9, p. 5471–5484, 2010.

JALEWA, J.; SHARMA M.K.; HÖLSCHER, C. Novel Incretin analogues improve autophagy and protect from mitochondrial stress induced by rotenone in SH-SY5Y cells. **Journal of Neurochemistry** . v. 1, n. 1, p. 1–28, 2016.

KAMANGAR, F. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 17, n. 1, p. 1262–1268, 2008.

KARABAY, A.Z.; KOC, A.; GURKAN-ALP, A.S.; BUYUKBINGOL, Z.; BUYUKBINGOL, E. Inhibitory effects of indole  $\alpha$ -lipoic acid derivatives on nitric oxide production in LPS/IFN $\gamma$  activated RAW 264.7 macrophages. **Cell Biochemistry & Function**. v. 33, n. 3, p.121–127, 2015.

KIM, Y.;CHOO, S.; RYOO, I.;YOO, J.; AHN, J.; YOO, I. Chemical constituents from the leaves of *Ilex paraguariensis* inhibit human neutrophil elastase. **Archives of Pharmacal Research** . v. 32, n. 9, p. 1215–1220, 2009.

KIM, H.; CHOI, W.; SORSCHER, N.; PARK, H.J.; TRONCHE, F.; PALMITER, R.; XIA, Z. Genetic reduction of mitochondrial complex I function does not lead to loss of dopamine neurons in vivo. **Neurobiology of Aging**. v. 36, n. 9, p. 2617–2627, 2015.

KOLAHDOUZAN, M.; HAMADEH, M.J. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. **CNS Neurosci. Ther.** v. 23, n. 1, p. 272–290, 2017.

KOUTSILIERI, E.; SCHELLER, C.; TRIBL, F.; RIEDERER, P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress–microglial contribution. **Parkinsonism Relat. Disord.** v. 8, n. 1, p. 401–406, 2002.

KRAUSE, L.C.; FREITAS, L.S.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V.; CARAMÃO, E.B. Influence of drying methods and agronomic variables on the chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) obtained from high-pressure CO<sub>2</sub> extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 1, p. 10081–10085.

LAFFON, B.; FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N.; COSTA, C.; PÁSARO, E.; VALDIGLESIAS, V. Comparative study of human neuronal and glial cell sensitivity for in vitro neurogenotoxicity testing. **Food and Chemical Toxicology**. v. 102, n. 1, p. 120–128, 2017.

LAHAIE-COLLINS, V.; BOURNIVAL, J.; PLOUFFE, M.; CARANGE, J.; MARTINOLI, M. G. Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 1, n. 1, p. 54–62, 2008.

LANZETTI, M.; BEZERRA, F.S.; ROMANA-SOUZA, B.; BRANDO-LIMA, A.C.; KOATZ, V.L.; PORTO, L.C.; VALENCA, S.S. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**. v. 24, n. 4, p.375–381, 2008.

LEE, Y.C.; LIN, C.H.; WU, R.M.; LIN, M.S.; LIN, J.W.; CHANG, C.H.; LAI, M.S. Discontinuation of statin therapy associates with Parkinson disease: a population-based study. **American Academy of Neurology Journals**. . v. 81, n. 5, p. 410–416, 2013.

LEE, J.E; PARK, J.H; JANG, S.J; KOH, H.C. Rosiglitazone inhibits chlorpyrifos-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 278, n. 2, p. 159–171, 2014.

LEITAO, A.C., BRAGA, R.S. Mutagenic and genotoxic effects of mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. . v. 27, n. 7, p. 1517–1525, 1994.

LEONARD, S. S.; HOGANS, V. J.; COPPES-PETRICORENA, Z.; PEER, C. J.; VINING, T. A.; FLEMING, D. W.; HARRIS, G. K. Analysis of free-radical scavenging of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) using electron spin resonance and radical-induced DNA damage. **Journal of Food Science**. v. 75, n. 1, p. C14-C20, 2010.

LI, X.Z.; ZHANG, S.N.; LIU, S.M.; LU, F. Recent advances in herbal medicines treating Parkinson's disease. **Fitoterapia**. v. 84, n. 1, p. 273–285, 2013.

LIMA, N. S.; OLIVEIRA, E.; SILVA, A. P. S.; MAIA, L. A.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. **Life Sciences**. v. 115, n. 1-2, p. 29–35, 2014.

LIU, B.; GAO, H.M.; HONG, J.S. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injury: role of neuroinflammation. **Environmental Health Perspectives**. v. 111, n. 8, p. 1065–1073, 2003.

LIU, B.; HONG, J.S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 304, n. 1, p. 1–7, 2003.

LIU, G.; ZHANG, C.; YIN, J.; LI, X.; CHENG, F.; LI, Y.; YANG, H.; UEDA, K.; CHAN, P.; YU, S. "Alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity". **Neuroscience Letters**. v.454, n. 3, p. 187-192, 2009.

LIU, S. M.; LI, X. Z.; HUO, Y.; LU, F. Protective effect of extract of *Acanthopanax senticosus* Harms on dopaminergic neurons in Parkinson's disease mice. **Phytomedicine**. v. 19, n. 1, p. 631–638, 2012.

LORIA, D.; BARRIOS, E.; ZANETTI, R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 25, n. 6, p. 530–539, 2009.

LUDWIG, I.A.; CLIFFORD, M.N.; LEAN, M.E.; ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food & Function**. v. 5, n. 8. p. 1695-1717, 2014.

LUZ, A.B.G.; DA SILVA, C.H.B.; NASCIMENTO, M.V.P.S.; DE CAMPOS FACCHIN, B.M.; BARATTO, B.; FRÖDE, T. S.; REGINATTO, F.H.; DALMARCO, E. M. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **Int Immunopharmacol**. v.36, n. 1, p. 165-172, 2016.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**.v. 380, n. 1-2, p. 50-58, 2007.

MADEN, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. **Neuroscience**. v. 8, n. 10, p. 755-765, 2007.

MANSOURI, M.T.; FARBOOD, Y.; SAMERI, M.J.; SARKAKI, A.; NAGHIZADEH, B.; RAFEIRAD, M. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food Chemistry**. . v. 138, n. 2-3, p. 1028– 1033, 2013.

MARINHO, M.S.; CHAVES, P.M.; TARABAL, T.O. Dupla-tarefa na Doença de Parkinson: uma revisão sistemática de ensaios clínicos aleatorizados. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**. v. 17, n.1, p. 2014.

MÁRQUEZ, V.; MARTÍNEZ, N.; GUERRA, M.; FARIÑA, L.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E. Characterization of aroma-impact compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using GC–olfactometry and GC–MS. **Food Research International**. v. 53, n. 2, p. 808–815, 2013.

MARTINET, A.; NDJOKO, K.; TERREAUX, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. NMR and LC–MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical Analysis**. v. 12, n. 1, p.48–52, 2001.

MARTINS, F.; SUZAN, A.J.; CERUTTI, S.M.; ARÇARI, D.P.; RIBEIRO, M.L.; BASTOS, D.H.M.; CARVALHO, P.O. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **British Journal of Nutrition**. v. 101, n. 1, p. 527–532, 2009.

MARTINS, F.; NOSO, T.M.; PORTO, V.B.; CURIEL, A.; GAMBERO, A.; BASTOS, D.H.; RIBEIRO, M.L.; CARVALHO, P.O. Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and

has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**. v. 18, n. 1, p. 42–47, 2010.

MATSUMOTO, R.L.T.; BASTOS, D.H.M. Effects of maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n. 1, p. 1775–1780, 2009.

MCGEER, P.L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B.E.; MCGEER, E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **American Academy of Neurology Journals**. v. 38, n. 8, p. 1285–1291, 1988.

MENINI, T.; HECK, C.; SCHULZE, J.; DE MEJIA, E.; GUGLIUCCI, A. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. **Planta Med**. v. 73, n. 11, p.1141–1147, 2007.

MICHEL, P. P.; HIRSCH, E. C.; HUNTS, S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. **Neuron**. v. 90, n. 4, p. 675-691, 2016.

MIRANDA, D.D.; ARÇARI, D.P.; PEDRAZZOLI, J.JR.; CARVALHO, P.DE.O.; CERUTTI, S.M.; BASTOS, D.H.; RIBEIRO, M.L.. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**. v. 23, n. 4, p. 261–265, 2008.

MORABITO, C.; ROVETTA, F.; BIZZARRI, M.; MAZZOLENI, G.; FANÒ, G.; MARIGGIÒ, M.A. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 48, n. 4, p. 579-589, 2010.

MORE, S.V.; KUMAR, H.; KANG, S.M.; SONG, S.Y.; LEE, K.; CHOI, D.K. Advances in neuroprotective ingredients of medicinal herbs by using cellular and animal models of Parkinson's disease. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**. v. 2013, n. 1, p. 957875, 2013.

MORRIS, M.E. Movement disorders in people with Parkinson disease: a model for physical therapy. **Physical Therapy**. v. 80, n. 6, p. 578-97, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUÑOZ-SORIANO, V.; PARICIO, N. Drosophila Models of Parkinson's Disease: Discovering Relevant Pathways and Novel Therapeutic Strategies. **Parkinsons Disease**. v. 2011, n. 1, p. 520-640, 2011.

MUÑOZ-CULLA, M.; SÁENZ-CUESTA, M.; GUERCA-BARANDIARAN, M. J.; RIBEIRO, M. L.; OTAEGUI, D. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) inhibits lymphocyte activation in vitro. **Food & Function**. v. 7, n. 11, p. 4556-4563, 2016.

MUZERENGI, S.; CLARKE, C. E. Initial drug treatment in Parkinson's disease. **Therapeutics**. v. 351, n.1, p. 1-5, 2015.

NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C. **Neurodegeneration**. In: SYDOR, A.; BROWN, R.Y. Editors Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience. 2<sup>a</sup> edition. New York: McGraw Hill, p. 409-442, 2009.

NOCERA, J.R.; BUCKLEY, T.; WADDELL, D.; OKUN, M.S.; HASS, C.J. Knee extensor strength, dynamic stability, and functional ambulation: are they related in Parkinson's disease? **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. v. 91, n. 4, p. 589-595, 2010.

NOYCE, A.J.; BESTWICK, J.P.; SILVEIRA-MORIYAMA, L.; HAWKES, C.H.; GIOVANNONI G.; LEES, A.J.; SCHRAG, A. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. **Annals of Neurology**. v. 72, n. 6, p. 893-901, 2012.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal Nutrition**. v. 131, n. 1, p. 66-71, 2001.

PEREIRA, D.; GARRETT, C. Fatores de risco da Doença de Parkinson um estudo epidemiológico. **Acta Medica Portuguesa**. v. 23, n. 1, p. 15-24, 2010.

PETZER, J.P.; CASTAGNOLI N, JR.; SCHWARZSCHILD, M.A.; CHEN, J.F.; VAN DER SCHYF, C.J. Dual-target-directed drugs that block monoamine oxidase B and adenosine A<sub>2A</sub> receptors for Parkinson's disease. **Neurotherapeutics**. v. 6, n. 1, p. 141-151, 2009.

PETZER, J.P.; PETZER, A. Caffeine as a lead compound for the design of therapeutic agents for the treatment of Parkinson's disease. **Current Medicinal Chemistry**. v. 22, n. 8, p. 975-988, 2015.

PINTOS, J.; FRANCO, E.L.; OLIVEIRA, B.V.; KOWALSKI, L.P.; CURADO, M.P.; DEWAR, R. Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. **Epidemiology**. v. 5, n. 6, p. 583-590, 1994.

PITTLER, M.H.; SCHMIDT, K.; ERNST, E. Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review. **Obesity Reviews**. v. 6, n. 2, p. 93-111, 2005.

PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES T. D. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord**. v. 29, n. 13, p. 1583-1590, 2014.

POHANKA, M. The perspective of caffeine and caffeine derived compounds in therapy. **Bratislava Medical Journal**. v. 116, n. 9, p. 520-530, 2015.

PONG, N.Y.; OR, T.C.; NY, I.P. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. **Neurochem Int**. v. 89, n. 1, p. 260-270, 2015.

PUANGPRAPHANT, S.; DE MEJIA, E.G. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFkappaB pathways. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 57, n. 19, p. 8873-8883, 2009.

PUANGPRAPHANT, S.; BERHOW, M. A.; VERMILLION, K.; POTTS, G.; DE MEJIA, E. G. Dicafeoylquinic acids in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF720 jB



nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 55, n. 1, p. 1509–1522, 2011.

QI, H.; LI, S. Dose-response meta-analysis on coffee, tea and caffeine consumption with risk of Parkinson's disease. **Geriatrics & Gerontology International**. v. 14, n. 2, p. 430-439, 2014.  
QIN, L.; WU, X.; BLOCK, M.L.; LIU, Y.; BREESE, G.R.; HONG, J.S.; KNAPP, D.J.; CREWS, F.T. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**. v. 55, n. 5, p. 453-462, 2007.

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. **Mutation Research**. v. 554, n. 1-2, p. 53–65, 2004.

RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H.; DE MEJIA, E. G. Inhibitory effect of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts on the proliferation of human head and neck squamous carcinoma cells. **Toxicol Rep**. v. 3, n. 1, p. 269-278, 2016.

RAMSEY, C.P.; TANSEY, M.G. A survey from 2012 of evidence for the role of neuroinflammation in neurotoxin animal models of Parkinson's disease and potential molecular targets. **Experimental Neurology**. v. 256, n. 1, p. 126–132, 2014.

REES, K.; STOWE, R.; PATEL, S.; IVES, N.; BREEN, K.; CLARKE, C.E.; BEN-SHLOMO, Y. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as disease-modifying agents for Parkinson's disease: evidence from observational studies. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 11, n. 1, 2011.

REGO, D.C.; MENÉNDEZ, O.C.; MEHN, M.C.; SANTANA, R.A. Demencia com corpos de Lewy. Apresentação de 1 caso. **Revista Cubana de Medicina**. v. 43, n. 5-6, p. 1-6, 2004.

RÍOS, J.L.; ONTENIENTE, M.; PICAZO, D.; MONTESINOS, M.C. Medicinal Plants and Natural Products as Potential Sources for Antiparkinson Drugs. **Planta Medica**. v. 82, n. 11-12, p. 942-951, 2016.

RODRÍGUEZ, S.; UCHIDA, K.; NAKAYAMA, H. Striatal TH-immunopositive fibers recover after an intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in golden hamsters treated with prednisolone: Roles of tumor necrosis factor- and inducible nitric oxide synthase in neurodegeneration. **Neuroscience Research**. v. 76, n. 1-2, p. 83-92, 2013.

ROJAS, P.; SERRANO-GARCIA, N.; MARES-SAMANO, J. J.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; OGREN, S. O. EGb761 protects against nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice: role of oxidative stress. **European Journal of Neuroscience**. v. 28, n. 1, p. 41–50, 2008.

ROJAS, P.; MONTES, S.; SERRANO-GARCIA, N.; ROJAS-CASTANEDA, J. Effect of EGb761 supplementation on the content of copper in mouse brain in an animal model of Parkinson's disease. **Nutrition**. v. 25, n. 1, p. 482–485, 2009.

ROSENFELDT, F.; WILSON, M.; LEE, G.; KURE, C.; OU, R.; BRUAN, L.; HAAN, J. Oxidative Stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. **Experimental Gerontology**. v. 48, p. 45-54, 2013.

ROSS, G.W.; ABBOTT, R.D.; PETROVITCH, H.; MORENS, D.M.; GRANDINETTI, A.; TUNG, K.H.; TANNER, C.M.; MASAKI, K.H.; BLANCHETTE, P.L.; CURB, J.D.; POPPER, J.S.; WHITE, L.R. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. **Journal of the American Medical Association**. v. 283, n. 20, p. 2674-2679, 2000.

ROSHAN, M.H.; TAMBO, A.; PACE, N.P. Potential Role of Caffeine in the Treatment of Parkinson's Disease. **Open Neurol J**. v. 10, n. 1, p. 42-58, 2016.

SANCHEZ-REUS, M.I.; GOMEZ DEL RIO, M. A.; IGLESIAS, I.; ELORZA, M.; SLOWING, K.; BENEDI, J. Standardized Hypericum perforatum reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenoneexposed rats. **Neuropharmacology**. v. 52, n. 1, p. 606-616, 2007.

SASHOURPOUR, M.; ZAHRI, S.; RADJABIAN, T.; RUF, V.; PAN-MONTOJO, F.; MORSHEDI, D. A study on the modulation of alpha-synuclein fibrillation by *Scutellaria pinnatifida* extracts and its neuroprotective properties. **PLoS One**. v.12, n. 9, p. e0184483, 2017.

SCHAPIRA, A.H.V.; OLANOW, C.W.; GREENAMYRE, J.T.; BEZARD, E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. **The Lancet**. v. 384, n. 9942, p. 545-555, 2014.

SCHUBERT, A. et al. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire **Die Pharmazie**. v. 62, n. 1, p. 876-880, 2007.

SILVA, B.A.; EINARSDOTTIR, O.; FINK, A.L.; UVERSKY, V.N. Biophysical Characterization of alpha-synuclein and rotenone Inte ration. **Biomolecules**. v. 3, n. 3, p. 703-732, 2013.

SIMÓN-SÁNCHEZ, J.; *et al.* Genome-wide associatation study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. **Nature Genetics**. v. 41, n. 12, p. 1308-1312, 2009.

SINHA, K.; DAS, J.; PAL, P.B.; SIL, P.C. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of Toxicology**. v. 87, n. 7, p.1157-1180, 2013.

SOLANKI, I.; PARIHAR, P.; PARIHAR, M.S. Neurodegenerative diseases: From available treatments to prospective herbal therapy. **Neurochem Int**. v. 95, n. 1, p. 100-108, 2016.

SONG, J.X.; SZE, S.C.; NG, T.B.; LEE, C.K.; LEUNG, G.P.; SHAW, P.C.; TONG, Y.; ZHANG, Y.B. Anti-Parkinsonian drug discovery from herbal medicines: what have we got from neurotoxic models? **Journal of Ethnopharmacology**. v. 139, n. 3, p. 698-711, 2012.

SOUZA, R.G.; BORGES, V.; SILVA, S.M.; FERRAZ, H.B. Quality of life scale in Parkinson's disease PDQ-39 - (Brazilian Portuguese version) to assess patients with and without levodopa motor fluctuation. **Arquivos Neuropsiquiatria**. v. 65, n. 3B, p. 787-791, 2007.

SOUZA, C.F.M.; ALMEIDA, H.C.P.; SOUSA, J.B.; COSTA, P.H.; SILVEIRA, Y.S.S.; BEZERRA, J.C.L. A Doença de Parkinson e o processo de envelhecimento motor: Uma revisão de literatura. **Revista Neurociência**. v. 19, n. 4, p.718-723, 2011.

SOUZA, A. H. P.; CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; SANTOS-BUELGA, C.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; MATSUSHITA, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**. v. 78, n. 1, p. 286-294, 2015.

STOJKOVSKA, I.; WAGNER, B.M.; MORRISON, B.E. Parkinson's disease and enhanced inflammatory response. **Experimental Biology and Medicine**. v. 240, n. 11, p. 1387-1395, 2015.

STRASSMANN, B.B.; VIEIRA, A.R.; PEDROTTI, E.L.; MORAIS, H.N.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, n. 18, p. 8348–8353, 2008.

SUDATI, J.H.; VIEIRA, F.A.; PAVIN, S.S.; DIAS, G.R.; SEEGER, R.L.; GOLOMBIESKI, R.; ATHAYDE, M.L.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.; BARBOSA, N.V. Valeriana officinalis attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. **Neurotoxicology**. v. 37, n. 1, p. 118-26, 2013.

SUGIMOTO, S.; NAKAMURA, S.; YAMAMOTO, S.; YAMASHITA, C.; ODA, Y.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Brazilian natural medicines. III. structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 57, 257–261. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 57, n. 3, p. 257-261, 2009.

TAI, K. K.; TRUONG, D. D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, reduces dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT)-induced cell death in dopaminergic SHSY-5Y cells. *Neuroscience Letters*. v. 482, n. 1, p. 183–187, 2010.

TAKETA, A.T.; GNOATTO, S.C.; GOSMANN, G.; PIRES, V.S.; SCHENKEL, E.P.; GUILLAUME, D. Triterpenoids from Brazilian *Ilex* species and their in vitro antitrypanosomal activity. **Journal of Natural Products**. v. 67, n. 10, p.1697–1700, 2004.

TAYLOR, J.M.; MAIN, B.S.; CRACK, P.J. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**. v. 62, n. 5, p. 803-819, 2013.

TEIVE, H.A.G. Etiopatogenia da Doença de Parkinson. **Revista Neurociência**. v. 13, n. 4, p. 201-214, 2005.

TENOIO, S. M. D.; TORIJA, I. S. Mineral elements in mate herb (*Ilex paraguariensis* St. H.). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v. 41, n. 1, p. 441–454, 1991.

TRABER, M.G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Mineral and Electrolyte Metabolism**. v. 23, n. 3-6, p. 135-9, 1997.

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm (Vienna)**. v. 124, n. 8, p. 901–905, 2017.

TWEEDIE, D.; LUO, W.; CURTO, R. G.; BROSSI, A.; HOLLOWAY, H. W.; LI, Y.; YU, Q. S.; GREIG, N. H. Um modelo celular de inflamação para identificar inibidores de síntese de TNF- $\alpha$ . **Journal of Neuroscience Methods**. v. 183, n. 2, p. 182-187, 2009.

ULLRICH, S.; DE VRIES, Y.; KÜHN, S.; REPANTIS, D.; DRESLER, M.; OHLA, K. Feeling smart: effects of caffeine and glucose on cognition, mood and selfjudgment. **Physiol Behav**. v. 151, n. 1, p. 629-637, 2015.

URBANSKA, A.M.; ZOLLA, V.; VERZANI, P.; SANAMBROGIO, L. Physiological and Pathological Role of Reactive Oxygen Species in the Immune Cells. **Immunology of aging and cancer development**. p. 309-321, 2014.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VASSALLO, A.,CORREA, P.; DE STÉFANI, E.; CENDPAN, M.; ZAVALA,D.; CHEN, V.; CARZOGLIO, J.; DENEIO-PELLEGRINI, H. Esophageal cancer in Uruguay, a case–control study. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 75, n. 6, p. 1005–1009, 1985.

VERA GARCÍA, R.; BASUALDO, I.; PERALTA, I.; DE HEREBIA, M.; CABALLERO, S.Minerals content of Paraguayan yerba mate (*Ilex paraguariensis*, S.H.). **Archivos Latinoamericanos De Nutricion**. v. 47, n. 1, p. 77–80, 1997.

VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; GUÉGAN, C.; WU, D. C.; TEISMANN, P.; CHOI, D.K.; TIEU, K.; PRZEDBORSKI, S. The role of glial cells in Parkinson's disease. **Curr. Opin. Neurol**. v. 14, n. 1, p.483–489, 2001.

VORONOV, E.; CARMI, Y.; APTE. R.N. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. **Frontiers in Physiology**. v. 5, n. 1, p. 114-121, 2014.

WAHNER, A.D.; BRONSTEIN, J.M.; BORDELON, Y.M.; RITZ, B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may protect against Parkinson disease. **American Academy of Neurology Journals**. v. 69, n. 19, p. 1836-1842, 2007.

WALKER, Z.; POSSIN, K.L.; BOEVE, B. F.; AARSLAND, D. Lewy body dementias. **The Lancet**. v. 386, n. 10004, p. 1683-1697, 2015.

WHO, **Neurological Disorders public health challenges**. p.1–232, 2015.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H.O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**. v. 26, n. 1, p. 51-58, 2011.

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; OKLEJEWICZ, B.; BUGNO, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes in vitro. **Mutation Research**. v. 679, n. 1-2, p. 18-23, 2009.

WROBEL, K.; WRÓBEL, K.; URBINA, E.M. Determination of total aluminum, chromium, copper, iron, manganese, and nickel and their fractions leached to the infusions of black tea, green tea, *Hibiscus sabdariffa*, and *Ilex paraguariensis* (mate) by ETA-AAS. **Biological Trace Element Research**. v. 78, n. 1-3, p. 271-280, 2000.

XIE, H. R.; HU, L. S.; LI, G. Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chinese Medical Journal**. v. 123, n. 8, p. 1086-1092, 2010.

YANG, L.; CALINGASAN, N.Y.; CHEN, J.; LEY, J.J.; BECKER, D.A.; BEAL, M.F. A novel azulenyl nitron antioxidant protects against MPTP and 3-nitropropionic acid neurotoxicities. **Exp. Neurol**. v. 191, n. 1, p. 86-93, 2005.

ZANOELO, E.F.; BENINCA, C. Chemical kinetics of 5-o-caffeoylquinic acid in superheated steam, effect of isomerization on mate (*Ilex paraguariensis*) manufacturing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 57, n. 24, p. 11564-11569, 2009.

ZHANG, J.; PERRY, G.; SMITH, M.A.; ROBERTSON, D.; OLSON, S.J.; GRAHAM, D.G.; MONTINE, T. J. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. **American Journal of Pathology**. v. 154, n. 5, p.1423-1429, 1999.

ZHANG, L.; ZHANG, C.; CAI, Q.; CHAN, P.; UÉDA, K.; YU, S.; YANG, H. Semiquantitative analysis of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. **Brain Research**. v.9 n. 1244 p. 40-52, 2008.

ZHANG, Y.; LIU, L.; LIU, Y.Z.; SHEN, X.L.; WU, T.Y.; ZHANG, T.; WANG, W.; WANG, Y.X.; JIANG, C.L. NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 18, n. 8, p. 1-8, 2015.

ZHOU, F.; WU, J.Y.; SUN, X.L.; YAO, H.H.; DING, J.H.; HU, G. Iptakalim alleviates rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons through inhibiting microglia-mediated neuroinflammation. **Neuropsychopharmacology**. v. 32, n. 1, p. 2570-2580, 2007.

ZUIN, V.G.; MONTERO, L.; BAUER, C.; POPP, P. Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. **Journal of Chromatography A**. v. 1091, n. 1-2, p. 2-10, 2005.