

Universidade Federal do Rio de Janeiro

EFEITOS DO CONSUMO DA ERVA MATE NO TECIDO ADIPOSEO  
BRANCO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Victor Machado de Mello Andrade

Rio de Janeiro

2023

# EFEITOS DO CONSUMO DA ERVA MATE NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Victor Machado de Mello Andrade

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Endocrinologia (Medicina), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadores:

Mario Vaisman

Veronica Salerno Pinto

Luciane Cláudia Barcellos

## Ficha catalográfica

Andrade, Victor Machado de Mello

Efeitos do consumo da erva mate no tecido adiposo branco de ratas ovariectomizadas. / Victor Machado de Mello Andrade. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, 2023.

45 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Mario Vaisman, Veronica Salerno Pinto e Luciane Cláudia Barcellos

Tese (doutorado) – UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (Endocrinologia), 2023.

Referências: f. 39-44

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Ovariectomia. 3. Tecido Adiposo. 4. Termogênese. 5. Endocrinologia – Tese. I. Vaisman, Mario. II. Pinto, Veronica Salerno. III. Barcellos, Luciane Cláudia. IV. UFRJ, CCS, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (Endocrinologia). V. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Andreia de Oliveira Paim CRB - 7/5183

# EFEITOS DO CONSUMO DA ERVA MATE NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE RATAS OVARIETOMIZADAS

Victor Machado de Mello Andrade

Orientadores:

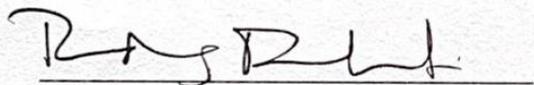
Mário Vaisman, Verônica Salerno Pinto, Luciane Cláudia Barcellos

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Endocrinologia (Medicina), no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

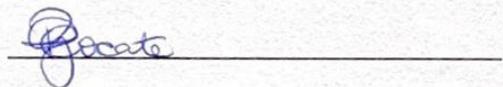
Aprovada por:



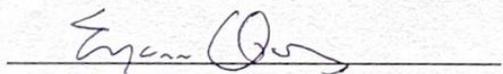
Presidente, Prof.



Prof. RODRIGO SOARES FORTUNATO



Prof. PAULA GUEDES COCATE



Prof. EMERSON LOPES OLIVARES

Prof. NORMA APARECIDA ALMEIDA FIGUEIREDO DE OLIVEIRA (ON-LINE)

Rio de Janeiro

2023

## **Agradecimentos**

À minha mãe e ao meu pai, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e vibrando a cada conquista. Agradeço por sempre me incentivarem nos momentos que me sinto desacreditado, por acreditarem no meu sucesso e no meu potencial. Sem o suporte de vocês, eu não estaria aqui escrevendo essa tese de doutorado. Obrigado por tudo!

Às minhas irmãs, Lívia e Viviane, por toda troca de experiência no mundo acadêmico mas, principalmente, pelo amor e carinho que sempre tiveram comigo. Sem vocês essa jornada seria muito mais desafiadora.

À minha orientadora Luciane, a qual está comigo desde o início da minha vida acadêmica. Obrigado por ter aberto as portas que me fizeram estar aqui hoje. Eu tenho uma imensa gratidão e admiração por você, como pessoa, professora, pesquisadora e, principalmente, como amiga.

À minha orientadora Verônica, pela qual tenho enorme admiração. Você influenciou e influencia muito na maneira que levo minha vida profissional. Obrigado por todos os puxões de orelha, conselhos e por sempre arranjar uma forma, dentre a imensidão de obstáculos, de seus alunos continuarem firmes e fortes desempenhando ciência de qualidade para o mundo acadêmico e para a sociedade. Você é um exemplo para todos nós.

Ao meu orientador Mário, por abrir as portas para realização desse doutorado. Sou extremamente grato à você.

À minha parceira Raquel, por me escutar dia e noite, por me alegrar nos dias que não estou bem, por celebrar as minhas vitórias, por apoiar minhas escolhas e, principalmente, por fazer parte da minha vida.

Às minhas alunas e amigas, Katlen e Amanda. Só nós sabemos o quão desafiadora foi essa jornada, porém, soubemos aproveitar e curtir cada momento. Sem vocês eu não teria conseguido. Obrigado.

Ao meu cunhado, Jon, por me ajudar com dicas e debates na publicação do artigo.

Aos amigos do LaBEMMol, Fábio, Camilli, Everton, Diego, Marcelo, Stephan, Jordan e Thalita, que acrescentaram muito a esse projeto, com conhecimento, debates, discussões e risadas. Obrigado por fazerem do laboratório um ambiente agradável e tranquilo de se trabalhar (na maioria das vezes, rs!)

# EFEITOS DO CONSUMO DA ERVA MATE NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

**Victor Machado de Mello Andrade**

**Orientadores:** Mário Vaisman, Luciane Claudia Barcellos, Verônica Salerno Pinto.

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Introdução:** A menopausa e pós menopausa estão associadas com o surgimento de doenças metabólicas e obesidade. Atualmente, o principal tratamento é a reposição hormonal. No entanto, a reposição de estrogênio pode gerar outros tipos de doenças como, por exemplo, câncer de mama. A *Ilex Paraguariensis* (erva Mate) vem sendo caracterizada como um potente agente anti-obesidade. Esse estudo teve como objetivo verificar o efeito do Mate no metabolismo energético de ratas ovariectomizadas.

**Métodos:** Após a ovariectomia, as ratas (3 meses de idade) foram tratadas com Mate (1g/kg do peso corporal) ou água (1 ml) por oito semanas. Os animais foram separados em 4 grupos: Sham (n=6), Sham Mate (n=6), OVX (n=8), OVX Mate (n=8). Após o período experimental, parâmetros bioquímicos no plasma foram analisados, assim como a análise histológica e proteica de UCP1 e Sirt1 no tecido adiposo branco (WAT).

**Resultados:** A erva Mate foi capaz de prevenir a obesidade em ratas ovariectomizadas, evidenciado pelos valores semelhantes ao grupo controle em relação as análises de peso do tecido adiposo visceral, triglicerídeos, colesterol total, LDL. A análise morfométrica do WAT mostrou uma menor hipertrofia dos adipócitos no grupo OVX-Mate vs OVX. Por fim, o Mate aumentou o conteúdo de UCP1 no WAT das ratas OVX, assim como também apresentou maiores valores da proteína Sirt1 em ambos os grupos que consumiram a erva .

**Conclusão:** O Mate tem uma potente ação preventiva no desencadeamento da obesidade em ratas ovariectomizadas e, possivelmente, esses benefícios podem ser extrapolados para um quadro de menopausa.

**Palavras chaves:** *Ilex paraguariensis*; Ovariectomia; Tecido adiposo; Termogênese.

## EFFECTS OF ERVA MATE CONSUMPTION ON WHITE ADIPOSE TISSUE IN OVARIECTOMIZED RATS

**Victor Machado de Mello Andrade**

**Advisors:** Mário Vaisman, Luciane Cláudia Barcellos, Verônica Salerno Pinto.

Summary of the Doctoral Thesis submitted to the Program of Post-graduation in Endocrinology, Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ, as part of the requirements for obtaining the Doctoral Degree in Science.

**Introduction:** Menopause and post-menopause are characterized by low levels of estrogen that can be associated with the emergence of metabolic diseases. While hormone replacement therapy can alleviate many symptoms, it can also exacerbate other diseases such as breast cancer. In the search for natural alternatives, *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate) has been identified as a potential therapy for the onset of obesity. Here, the effect of MATE consumption on white adipose tissue (WAT) was studied in ovariectomized rats, an animal model for post-menopause hormone loss.

**Methods:** Four groups of animals were used: ovariectomy with MATE (OVX MATE) and without MATE (OVX), as well as sham surgery with MATE (Sham MATE) and without MATE (Sham). MATE was provided by gavage at 1g/kg of body weight for eight weeks before measuring biochemical parameters in plasma and characterizing WAT morphology.

**Results:** The consumption of Yerba MATE significantly decreased weight gain in ovariectomized rats and presented near control levels of triglycerides, total cholesterol, and LDL. A morphometric analysis of WAT showed a significant decrease in the area occupied by adipocytes in the group that consumed MATE. Finally, MATE consumption increased the UCP1 content in the WAT of the ovariectomized group. Yerba MATE treatment was also associated with higher levels of SIRT1 protein.

**Conclusion:** MATE consumption has a preventive effect on the weight gain observed in ovariectomized rats and potential benefits in naturally avoiding the onset of obesity post menopause.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*; Ovariectomy; Adipose tissue; Thermogenesis.

# Sumário

<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
MENOPAUSA.....	14
ERVA MATE .....	16
TECIDO ADIPOSEO .....	18
<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>23</b>
<b>MÉTODOS:.....</b>	<b>24</b>
ANIMAIS: .....	24
OVARIECTOMIA:.....	24
DESENHO EXPERIMENTAL.....	24
QUANTIFICAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO VISCERAL: .....	25
PERFIL LIPÍDICO .....	25
TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE .....	26
QUANTIFICAÇÃO HORMONAL.....	26
HISTOLOGIA .....	26
TÉCNICA DE H&E .....	26
IMUNOHISTOQUÍMICA .....	27
ANÁLISE QUALITATIVA DE UCP1.....	27
WESTERN BLOT .....	28
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
COMITÊ DE ÉTICA.....	29
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS: .....</b>	<b>39</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS:.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>46</b>
ANEXO 1: COMITÊ DE ÉTICA .....	46

## **Lista de abreviações**

E2 – Estradiol

E3 - Estriol

PPAR $\gamma$  - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

Sirt-1 – Sirtuína 1

ER $\alpha$  – Receptor de estradiol alfa

ER $\beta$  – Receptor de estradiol beta

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

PI3K - Fosfoinosítídeo 3-quinase

AKT - Proteína quinase B

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

HDL – Lipoproteína de alta densidade

ApoB - Apolipoproteína B

UCP – Proteína desacopladora

BAT – Tecido adiposo marrom

WAT – Tecido adiposo branco

H<sup>+</sup> - Próton

ATP – Adenosina trifosfato

OVX – Ovariectomia

Sham – Simulação de ovariectomia

## **Lista de figuras**

Figura 1 – Influência dos estrogênios no tecido adiposo.

Figura 2 – Erva Mate utilizada no projeto.

Figura 3 – Representação do tecido adiposo branco e marrom.

Figura 4 – Acoplamento e desacoplamento mitocondrial.

Figura 5 – Processo de “browning” pela via Sirt-1.

Figura 6 – Desenho experimental.

Tabela 1 – Exibição do percentual dos compostos da erva Mate.

## Introdução

A crescente proporção de mulheres idosas e o aumento da expectativa de vida têm causado preocupações de saúde pública, especialmente no que se refere a alterações fisiológicas relacionadas ao período de menopausa e pós-menopausa. Aproximadamente 40% das mulheres buscam formas de tratamento para minimizar os sintomas induzidos pela menopausa, incluindo: dores de cabeça, transpiração noturna, ressecamento vaginal e alterações no sono (NACHTIGALL, 1998). Um outro importante aspecto na caracterização da menopausa é o declínio dos hormônios ovarianos, principalmente o estrogênio (MALTAIS; DESROCHES; DIONNE, 2009). Diversas alterações fisiológicas estão associadas com essa queda hormonal, tais como o aumento do risco de aterosclerose (SCHILLACI et al., 1998), Diabetes mellitus (ZOIS et al., 2009), perda de massa muscular (sarcopenia) (ELLIOTT; SALE; CABLE, 2002), perda de massa óssea (KEMMLER et al., 2004), mudanças na composição corporal, perfil lipídico, deposição de gordura (BROCHU et al., 2009; KEMMLER et al., 2004) e aumento de marcadores inflamatórios (PFEILSCHIFTER et al., 2002). De acordo com MUMUSOGLU & YILDIZ, (2019), essas alterações causadas pela menopausa podem levar a um quadro de síndrome metabólica. A síndrome metabólica é caracterizada pelo surgimento e combinação de pelo menos 3 fatores de risco como a obesidade, dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e hipertensão (CARR, 2003; ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

A obesidade gerada ao longo do tempo pela redução da produção de estrogênio, pode provocar um quadro de inflamação sistêmica, comprometendo as funções mitocondriais e, conseqüentemente, a termogênese, que desempenha um importante papel no gasto energético para manter a temperatura corporal (PRASUN, 2020).

Atualmente, a terapia hormonal com estradiol está disponível para mulheres que são afetadas pelos sintomas da menopausa. No entanto, esse tipo de tratamento pode ter efeitos colaterais, como o risco aumentado para acidente vascular cerebral, ataque cardíaco e câncer (ETTINGER et al., 2018; MARJORIBANKS et al., 2017; MATTAR et al., 2008). Nesse contexto, estratégias alternativas não hormonais, vem sendo estudadas com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios no metabolismo durante a menopausa/pós-menopausa. Algumas intervenções por compostos naturais vêm

apresentando resultados promissores no metabolismo lipídico, modulação de saciedade, efeito anti-adipogênico, termogênico e outros (LEE et al., 2016; MADAK-ERDOGAN et al., 2016; TARDIVO et al., 2015)

Um composto natural bastante consumido principalmente na América do Sul é a *Ilex paraguariensis*, ou erva Mate (MATE). Essa erva, utilizada para o preparo de chá, além de ser conhecida pelo seu efeito antioxidante (CHEMINET et al., 2021) e cardioprotetor (CAHUÊ et al., 2017), é também um potente agente modulador do metabolismo energético, influenciando tanto a oxidação de glicose quanto de lipídios (RESENDE et al., 2012; SILVA et al., 2011), provando ser um efetivo adjuvante na perda de peso, modulando a adipogênese (DOS SANTOS et al., 2018). Os efeitos adaptógenos da *Ilex paraguariensis* como agente antioxidante e modulador do metabolismo energético estão intimamente ligados com alguns de seus componentes, tanto os polifenóis quanto as saponinas e as metilxantinas (BURRIS et al., 2012).

Embora a literatura demonstre a melhora do metabolismo energético em ratos e humanos tratados com a erva Mate, não há na literatura dados disponíveis avaliando a influência dessa erva sobre as alterações sistêmicas consequentes à menopausa, sendo esse o objetivo principal da presente tese de doutorado. Este trabalho é fruto de uma parceria entre o Programa de Pós Graduação em Endocrinologia da Faculdade de Medicina da UFRJ e da Escola de Educação Física da UFRJ. A tese é composta por 1 artigo publicado na revista *“Molecular and Cellular Endocrinology”* intitulado *“Yerba Mate consumption by ovariectomized rats alters white adipose tissue”*.

## Revisão de literatura

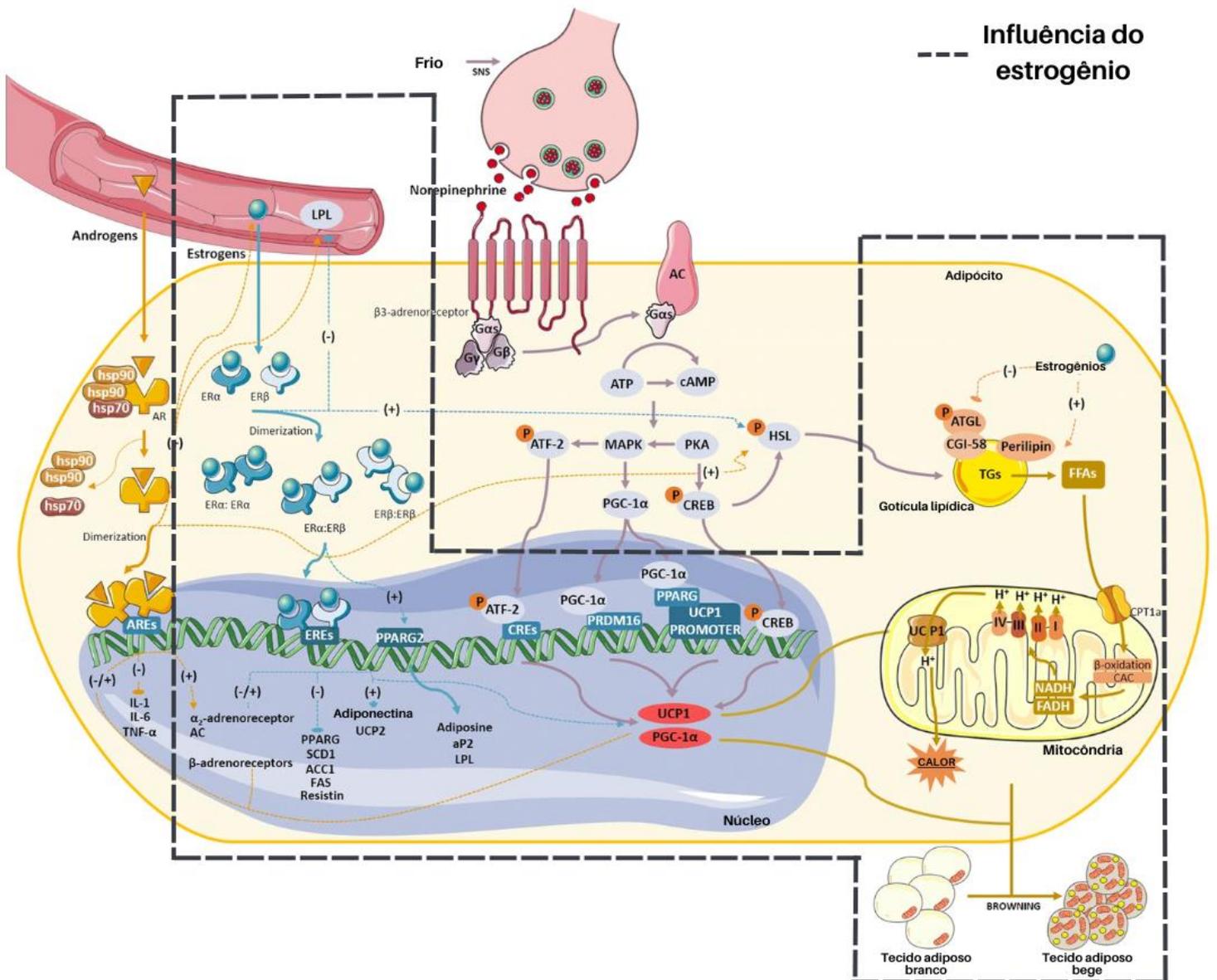
### Menopausa

Clinicamente, a menopausa é diagnosticada quando a mulher deixa de menstruar por pelo menos um ano devido a perda da atividade dos folículos ovarianos, o que geralmente ocorre entre os 45 – 55 anos de idade (LANDGREN et al., 2004). Esse fenômeno ocorre ao longo de vários anos e não em um único momento. É precedido por uma fase em que as mulheres experimentam ciclos menstruais irregulares, denominado como transição da menopausa (perimenopausa), que envolve lidar com a cessação da produção de ovócitos nos ovários.

A redução da produção de estrogênio e progesterona é a principal alteração fisiológica associada à menopausa. O estrogênio é o hormônio sexual feminino primário. Ele determina as características sexuais e afeta o desenvolvimento e funcionamento do sistema reprodutor. O estradiol (E2) está quase sempre presente no corpo de mulheres em idade reprodutiva, enquanto o estriol (E3), produzido pela placenta, é abundante principalmente durante a gravidez e desempenha um papel importante na manutenção da gravidez em estágio inicial (PATEL, 2017). Durante a vida fértil da mulher, o nível médio de estrogênio total é de 100 a 250 pg/mL. No entanto, a concentração de E2 na circulação pode diminuir para até 10 pg/mL após a menopausa (CERVELLATI; BERGAMINI, 2016). Essa redução hormonal está associada com diversas alterações fisiológicas como o risco aumentado para aterosclerose, diabetes mellitus, perda de massa muscular (sarcopenia), perda de massa óssea (osteoporose), mudanças na composição corporal, alteração do perfil lipídico e marcadores inflamatórios (BROCHU et al., 2009; ELLIOTT; SALE; CABLE, 2002; KEMMLER et al., 2004; MUMUSOGLU; YILDIZ, 2019).

Estudos epidemiológicos como o de Gravena et al., (2013), mostraram que, no Paraná (Brasil), entre 456 mulheres avaliadas na pós menopausa, 72,6% apresentavam sobrepeso e 63,6% apresentavam obesidade central. A maioria dos estudos sugerem que as mudanças na composição do corpo feminino coincidem com a menopausa. Isso

ocorre porque a maior parte dos receptores de estrogênio encontram-se nas células adiposas viscerais e subcutâneas, o qual exercem um papel fundamental no metabolismo lipídico e auxiliam na beta oxidação de ácidos graxos (LAFORREST et al., 2019). Além disso, o estrogênio regula enzimas que influenciam na eficiência do gasto energético, tais como PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$  (MOREIRA-PAIS et al., 2020).



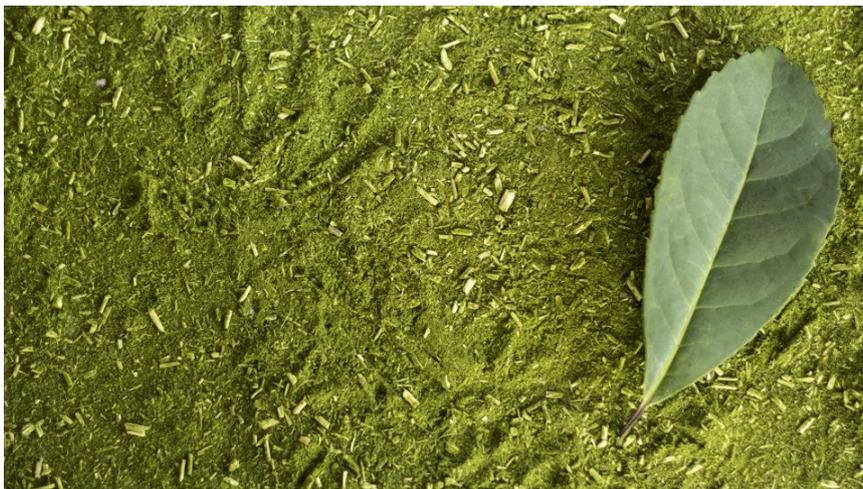
**Figura 1** – Influência dos estrogênios no adipócito. Área tracejada = via do estrogênio. Imagem adaptada (MOREIRA-PAIS et al., 2020).

Um outro fator que contribui para o aumento da adiposidade em mulheres pós-menopausa é a diminuição da taxa metabólica basal que está correlacionada com o

declínio gradativo da massa muscular a partir desse período (KO; JUNG, 2021). O motivo pelo qual ocorre a perda desse tecido ainda não é totalmente elucidado na literatura. SIPILÄ *et al.*, (2015) sugerem que o estrogênio tem um efeito direto na função neuromuscular e preservação da massa magra devido à grande quantidade de seus receptores (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) no músculo esquelético que regulam a via anabólica IGF-1/PI3K/AKT. SMITH *et al.*, (2014) observaram que a administração de progesterona em mulheres na menopausa e pós-menopausa foi associada a um aumento de 50% na taxa de síntese proteica muscular, enquanto o tratamento com reposição de estradiol não afetou a taxa de síntese, sugerindo que o estrogênio pode não influenciar de forma significativa na produção de novas proteínas contráteis. No entanto, ele observou que esse hormônio pode ter um papel protetor na degradação de proteínas musculares e aumentar a sensibilidade a estímulos anabólicos.

## Erva Mate

*Ilex Paraguariensis*, mais conhecida como erva Mate (Fig.2), é uma planta originária na região subtropical da América do Sul, incluindo Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. O extrato aquoso da erva-Mate é preparado principalmente na forma de quatro bebidas diferentes: chimarrão, Mate cozido, tererê e chá Mate.



**Figura 2** - Erva Mate triturada. Imagem retirada de <https://www.jardimdaservas.com.br/produtos/erva-Mate-natural-fina/>

A erva Mate tem sido relatada pela sua grande atividade biológica, a qual é atribuída a sua rica composição de polifenóis. Além dos polifenóis, como flavonoides (quercetina e rutina) e ácidos fenólicos (ácidos clorogênicos e caféicos), a erva-Mate também é rica em cafeína e saponinas (GOSMANN et al., 2012; RESENDE et al., 2012) (Tabela 1). Estudos mostram que o MATE possui excelentes propriedades farmacológicas para promoção da saúde, como melhora do sistema antioxidante (LEONARD et al., 2010; MATSUMOTO et al., 2009), protege contra danos induzidos ao DNA (MIRANDA et al., 2008), melhora da tolerância à glicose e resistência à insulina (ARÇARI et al., 2011), promove cardioproteção (CAHUÊ et al., 2017), possui efeitos termogênicos (CHOI et al., 2017), propriedades quimiopreventivas (PUANGPRAPHANT et al., 2011) e ao que parece, é um excelente composto natural na prevenção da obesidade (GAMBERO; RIBEIRO, 2015; VALENÇA et al., 2022).

**Tabela 1** - Composição química da erva Mate.

Compostos químicos	Composição em %	Efeitos conhecidos na saúde
Cafeoil	10.000	
Ácido clorogênico	2.800	Antioxidante, antimicrobial, antidiabético, analgésico
Ácido cafeico	0.023	Antioxidante
3,4-DCQ	0.855	Anticâncer, antioxidante
3,5-DCQ	3.040	Anticâncer, antioxidante
4,5-DCQ	2.890	
Saponinas	5 a 10%	Anticâncer, Anti-inflamatório, antiparasitário
Xantinas		
Cafeína	1 a 2%	Anticarcinogênico, antiobesidade, antioxidante, diurético, estimulante, vasodilatador
Teobromina	0.3 a 0.9%	Estimulante, diurético
Teofilina	0 a vestígio	Estimulante, vasodilatador
Rutina	0.060	Antioxidante, inibidor de lipoxigenase, anticâncer, anti-tumor, anti-úlceras
Quercetina	0.0031	Anticâncer, anti-inflamatório, antimicrobial
Kaempferol	0.0012	Anti-inflamatório, antimicrobial

Tabela adaptada do artigo de revisão de DE MORAIS et al., (2009).

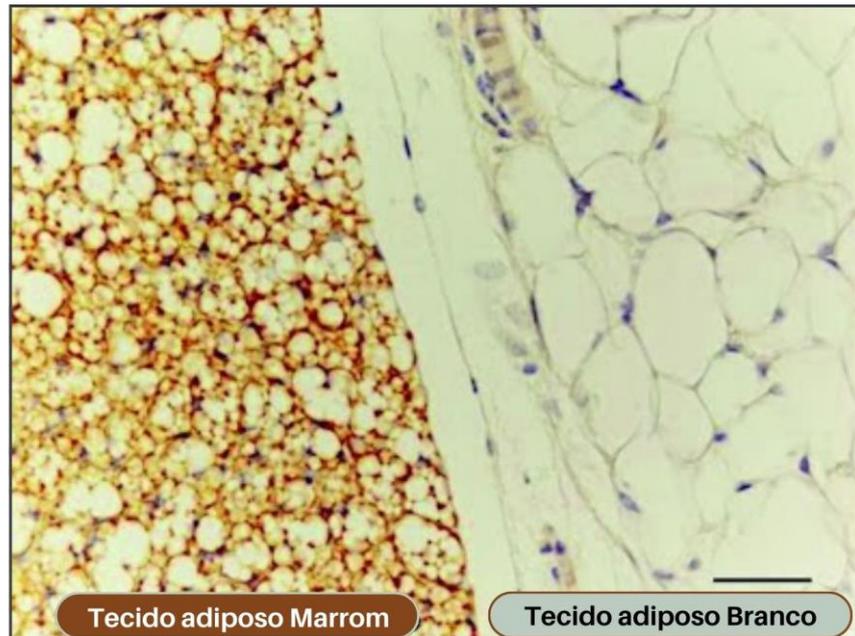
Muitos estudos foram publicados na última década sobre o MATE, mas dentre todos os seus benefícios à saúde, o que nos chamou a atenção foi o seu efeito antiobesidade, tema utilizado na presente tese de doutorado. Em 2001, foi realizado o primeiro estudo para avaliar tal efeito. Os autores demonstraram que uma preparação à base de ervas contendo MATE atrasou significativamente o esvaziamento gástrico, aumentando o tempo de sensação de saciedade e induziu uma perda de peso significativa ao longo de 45 dias em pacientes com excesso de peso (ANDERSEN; FOGH, 2001). KANG *et al.*, (2012)

observaram que camundongos alimentados com dieta rica em gordura, após 4 semanas consumindo erva Mate, reduziram significativamente o peso corporal, adiposidade, tamanho dos adipócitos e liberação de leptina pelo tecido adiposo. Além disso, também apresentaram redução significativa nos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol. Em outro estudo, DE MORAIS *et al.*, (2009), demonstraram efeitos de hipocolesterolemia em indivíduos dislipidêmicos com o consumo da erva Mate. Os autores observaram que após 20 e 40 dias de tratamento, houve uma redução significativa dos níveis circulantes de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C), apolipoproteína B (apo B), relação LDL-C/HDL-C e aumento de HDL-C.

Quando direcionamos o foco para o efeito do Mate no tecido adiposo, evidências mostram efeitos expressivos na termogênese e na inibição da adipogênese. PANG; CHOI; PARK, (2008) observaram o efeito termogênico dessa erva em ratos obesos por meio do aumento de proteínas desacopladoras (UCP2 e UCP3), responsáveis por dissipar energia em calor sem a produção de ATP nas mitocôndrias. Além disso, DOS SANTOS *et al.*, (2018) mostraram que o consumo de Mate em camundongos obesos promoveu biogênese mitocondrial no músculo esquelético e no tecido adiposo marrom (BAT) por meio da ativação das vias SIRT1 e PGC1 $\alpha$ , assim como aumentou o número de complexos na cadeia de transporte de elétrons. Somado a isso, eles também observaram uma promoção da termogênese por meio do aumento do conteúdo de UCP1 no BAT.

## Tecido adiposo

O armazenamento de energia como lipídios é um mecanismo extremamente importante para garantir a sobrevivência do ser humano. No organismo existem dois tipos principais de tecido adiposo: branco (WAT) e marrom (BAT), assim chamados devido a sua coloração (Fig. 3). Apesar dos dois armazenarem triglicerídeos no interior de suas células, elas possuem anatomia e funções bem diferentes. O WAT tem como função principal armazenar e fornecer energia para os mais diversos processos fisiológicos e mecânicos do organismo. Além disso, ele também é considerado um tecido endócrino devido a sua capacidade de liberar adipocinas que também participam da regulação do metabolismo do corpo (SCHERER, 2006).

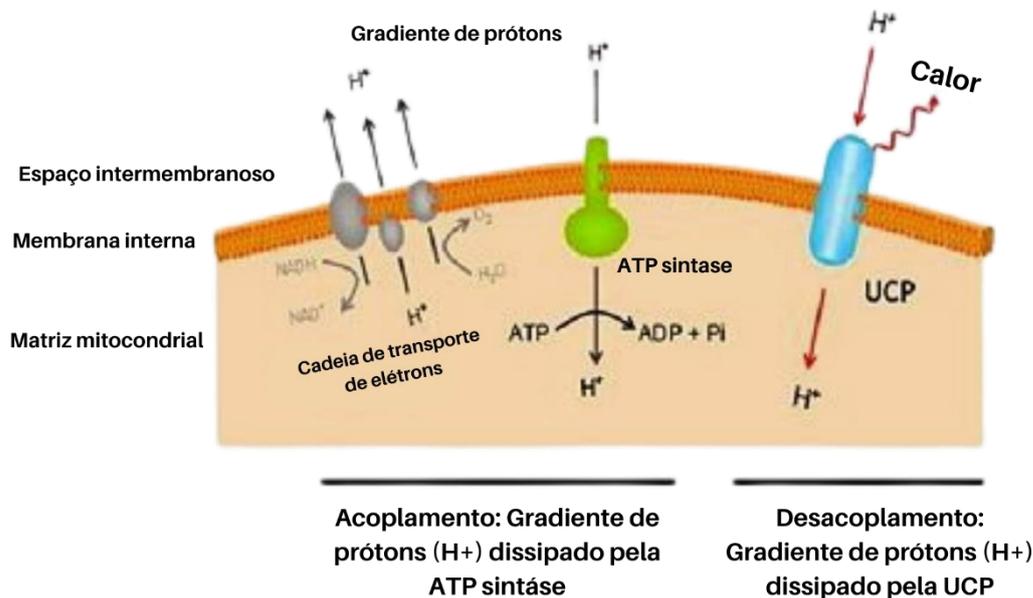


**Figura 3** - Representação do tecido adiposo marrom e branco por microscópio. Imagem adaptada do site <https://obesidadebioquimicaunb.wordpress.com/2017/06/24/tecido-adiposo-marrom/>

Assim como o WAT, o BAT também secreta adipocinas, mas a sua principal função é a termoregulação, ou seja, ele utiliza os triglicerídeos armazenados com intuito de produzir calor e manter a temperatura corporal. Isso ocorre porque, diferentemente do WAT, os adipócitos marrons possuem uma alta capacidade oxidativa, contendo um grande número de mitocôndrias e proteínas desacopladoras (UCP1) que, quando ativada catalisa o vazamento de prótons ( $H^+$ ) através da membrana mitocondrial, o que desacopla o complexo ATP sintase (Fig.4). A energia resultante derivada da oxidação do substrato é dissipada na forma de calor (FEDORENKO; LISHKO; KIRICHOK, 2012).

O tecido adiposo marrom é formado ainda no estágio embrionário, e seu estoque é extremamente limitado em comparação ao tecido adiposo branco. Em contrapartida, o WAT é distribuído por todo o corpo em vários depósitos distintos (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Esse tecido pode se expandir rapidamente com o excesso da ingestão calórica, aumentando o armazenamento lipídico no interior das células (hipertrofia) e também pelo aumento do número de adipócitos (hiperplasia) (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). Essa expansão do WAT pode gerar um quadro de obesidade que está

associado com o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, incluindo resistência à insulina, dislipidemia, esteatose hepática e diabetes tipo 2 (KOPELMAN, 2000).

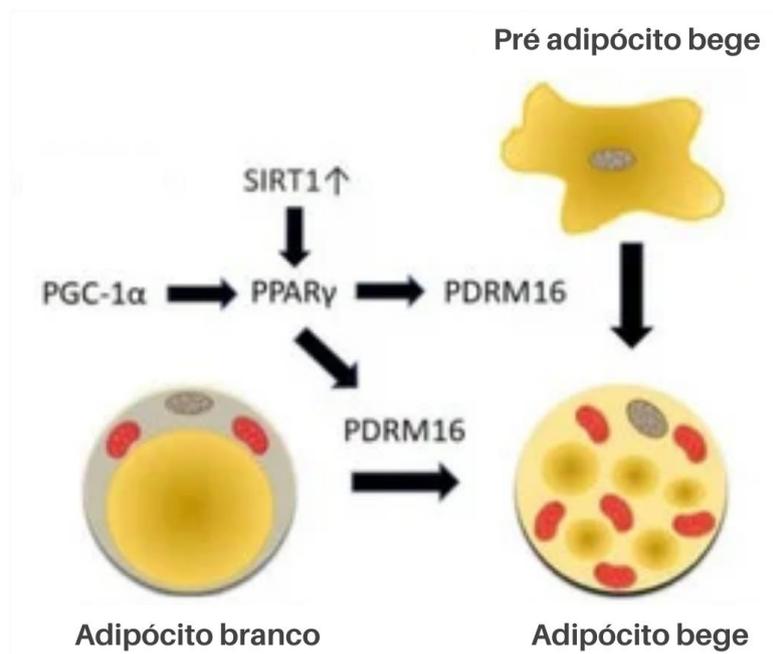


**Figura 4** - Representação do acoplamento e desacoplamento mitocondrial. Imagem adaptada do site (<http://mundodabioquimica.blogspot.com/2014/06/proteinas-desacopladoras.html>)

Há cerca de uma década, estudos mostraram um novo tipo de células adiposas, conhecidas como “adipócitos bege”. Esses adipócitos estão localizados no tecido adiposo branco mas possuem características semelhantes aos adipócitos marrons, como maior expressão de proteínas UCP1, maior quantidade de mitocôndrias, altos níveis de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e, assim como o BAT, os adipócitos beiges têm a capacidade de converter energia em calor. Entretanto, apesar do maior conteúdo de mitocôndrias quando comparado com o WAT, o tecido adiposo bege tem menor capacidade termogênica do que o BAT (WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013).

O surgimento de adipócitos beiges se dá a partir das células precursoras do WAT ou da transdiferenciação de adipócitos brancos já maduros. O que irá determinar a diferenciação em adipócitos beiges são os fatores externos, como por exemplo a exposição prolongada a ambientes frios (HARMS; SEALE, 2013). O processo de escurecimento do tecido adiposo branco é conhecido como “browning”. É importante enfatizar que os adipócitos bege podem regressar para adipócitos brancos caso o estímulo externo seja cessado (HARMS et al., 2014).

Assim como o frio, outros fatores podem induzir o processo de “browning”, sendo eles a prática de atividade física (ALDISS et al., 2018), ingestão de agentes farmacológicos (MERLIN et al., 2016) e o consumo de compostos naturais (BASKARAN et al., 2016). Esses fatores ativam diferentes vias de sinalização no interior das células para aumentar a ativação de BAT e o escurecimento de WAT. Uma das vias clássicas é a estimulação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos a partir da noradrenalina liberada com a exposição ao frio (SCHENA; CAPLAN, 2019). Outra via que contribui muito para a termogênese e que foi objeto de estudo dessa tese, é a via das sirtuínas (mais especificamente Sirt1). Essa proteína pode ser ativada por compostos dietéticos, restrição calórica ou exercício físico, promovendo biogênese mitocondrial e melhorando sua funcionalidade (CANTÓ et al., 2009; MILNE et al., 2007). A Sirt1 também promove o processo de “browning” por meio da desacetilação da proteína PPAR $\gamma$  (Fig. 5), que irá gerar uma cascata de ativação das proteínas downstream gerando a diferenciação dos adipócitos marrom/bege (QIANG et al., 2012).



**Figura 5** – Representação do processo de “Browning” pela via SIRT1. Imagem adaptada KURYŁOWICZ; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA (2020).

## **Justificativa**

A redução da produção de estrogênio, como por exemplo na menopausa, pode ser uma fase bem difícil para a mulher, principalmente no que diz respeito a desregulação do metabolismo e a modificação da composição corporal, podendo levar à obesidade e, por consequência, às doenças associadas a esse quadro. Hoje em dia, o tratamento mais comum para esse quadro é com a reposição hormonal. Apesar desse tratamento ser eficiente em relação aos problemas metabólicos, muitas mulheres não o realizam devido aos seus possíveis efeitos colaterais (ex.: câncer). Nesse contexto, se faz necessário a busca de tratamentos alternativos e naturais visando melhorar a vida dessas mulheres diante dessa redução hormonal. A erva Mate, como dito anteriormente, é um potente modulador do metabolismo energético e, embora a literatura evidencie um efeito anti-obesigênico em ratos e humanos tratados com essa erva, existem poucos dados disponíveis que avaliam a influência dessa erva nas alterações sistêmicas decorrentes da menopausa, especificamente no tecido adiposo.

## **Objetivo**

### **Geral:**

Avaliar os efeitos da Erva Mate no metabolismo energético de ratas ovariectomizadas.

### **Específico:**

Verificar se o Mate modula a morfologia do tecido adiposo branco;

Determinar se essa erva aumenta a termogênese a partir do processo de “browning” do tecido adiposo branco;

Avaliar o efeito do consumo de Mate a nível sistêmico no perfil lipídico e glicídico;

Verificar se o Mate reduz o ganho de peso corporal em ratas ovariectomizadas.

## **Métodos:**

### **Animais:**

Ratas Wistar, fêmeas (N = 28), com 4 semanas de idade, pesando entre 200g a 250g, foram mantidas em condições controladas de temperatura ( $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) com ciclo invertido de claro-escuro a cada 12 horas no biotério de experimentação animal do Laboratório de Biologia do Exercício da EEFD-UFRJ. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas, com no máximo 4 animais/gaiola, com livre acesso a água e ração padrão para animais de laboratório fornecida pela BIOBASE – ALIMENTOS PARA ANIMAIS SC/ BRASIL.

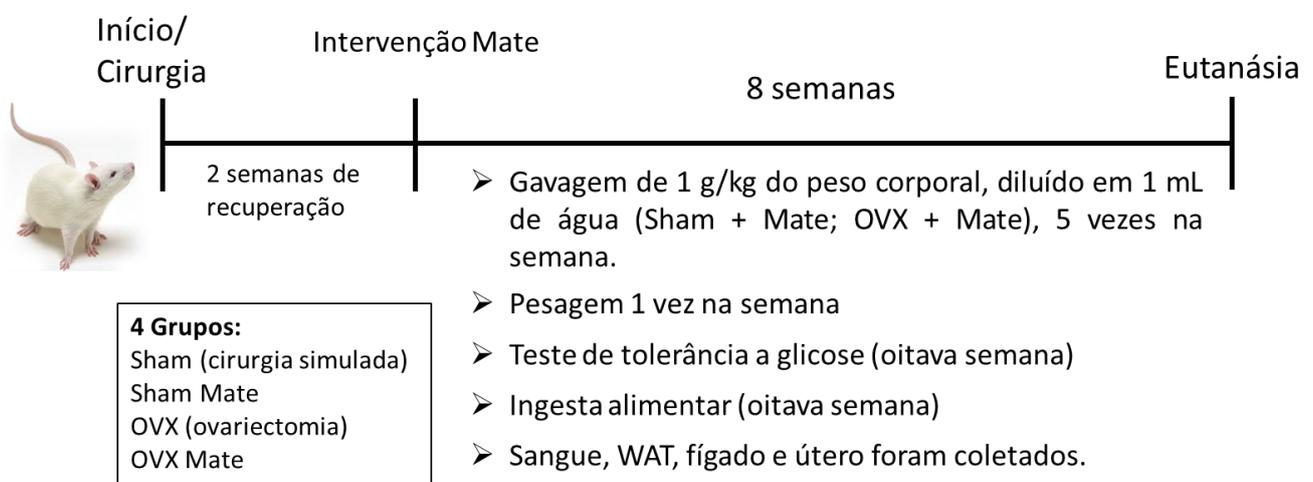
### **Ovariectomia:**

A ovariectomia bilateral foi realizada em ratas fêmeas anestesiadas com cetamina (0,5 mL/kg) e xilazina (0,125 mL/kg) através de injeção intraperitoneal (ip). As ratas foram submetidas a uma incisão para abrir a cavidade peritoneal, em seguida os túbulos uterinos foram expostos e os ovários removidos. Após este procedimento a cavidade peritoneal foi suturada e limpa. Os animais do grupo sham foram submetidos a uma cirurgia simulada, sendo realizada uma incisão e exposição dos túbulos uterinos sem a remoção dos ovários. Em seguida, os animais foram deixados em recuperação por 15 dias antes do início dos experimentos. Todos os animais receberam analgesia com Dipirona (200 mg/kg) por 7 dias.

### **Desenho experimental**

Os animais foram divididos em 4 grupos (fig. 6), cirurgia simulada (sham, n=6), cirurgia simulada com tratamento com Mate (sham + Mate, n=6), ratas ovariectomizadas (OVX, n=8) e ratas ovariectomizadas tratadas com Mate (OVX + Mate, n=8). A cirurgia de ovariectomia foi realizada quando os animais alcançassem o peso entre 200g à 250g. Após o período de recuperação (15 dias), o tratamento com *Ilex paraguariensis* (MATE) foi iniciado pelo método de gavagem. Foi utilizado o Mate comercial em pó solúvel liofilizado (Matte Leão solúvel) com a dosagem de 1 g/Kg do peso corporal de MATE diluído em água 1 mL de água nos grupos Sham + Mate e OVX + Mate. Essa dosagem foi baseada na sugestão de outros autores (DOS SANTOS et al., 2018; ROCHA et al., 2021).

Os grupos Sham e OVX foram gavados apenas com 1 mL de água. O tratamento foi realizado 5 vezes por semana durante 8 semanas, no horário de 10:30 às 11:30 AM. O peso corporal dos animais foi acompanhado ao longo de todas as semanas até o final do período experimental, e o consumo alimentar foi avaliado por 24 horas, em gaiolas individuais, na oitava semana do experimento. Após a eutanásia, realizada por guilhotina, o tecido adiposo visceral (retoroperitoneal), fígado e útero foram coletados e pesados. Além dos tecidos, 5 mL de sangue foi coletado em tubo heparinizado, centrifugado (1.800g x 15 min, 4 °C) e o plasma foi aliquoteado e armazenado em freezer -80 °C para análises posteriores.



**Figura 6** – Desenho experimental.

### Quantificação do tecido adiposo branco visceral:

O tecido adiposo branco foi quantificado por seu peso em gramas por meio da pesagem da gordura retroperitoneal retirada pela mesma pessoa em todos os animais no dia da eutanásia.

### Perfil lipídico

Para a análise do perfil lipídico, as concentrações séricas de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram analisadas por Kit comercial Bioclin®, seguindo o protocolo do fabricante.

## Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose foi realizado na oitava semana de tratamento. Os animais fizeram jejum de 12 horas e em seguida receberam uma injeção intraperitoneal de glicose, 1,5g/kg peso diluído em salina (NaCl 0,9%). Foram coletadas amostras nos tempos 0,30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose

## Quantificação hormonal

As concentrações séricas de insulina e adiponectina foram dosadas por meio de kit ELISA fornecido pela empresa FineTest.

## Histologia

O tecido adiposo branco foi fixado em composto O.C.T da Tissue-Tek. Em seguida, o tecido foi cortado no micrótomo Rotatory Microtome CUT 5062 (Slee Medical GMBH, Alemanha) em cortes escalonados à 5µm de espessura, para posterior coloração com hematoxilina e eosina e análises por imunohistoquímica. Foram capturadas 15 imagens digitais de campos aleatórios do tecido adiposo branco em uma câmera de alta resolução Olympus DP72 (Olympus Corporation, Japão) acoplada ao microscópio Olympus BX53 (Olympus Corporation, Japão).

## Técnica de H&E

Para clarificação do tecido, as lâminas foram submetidas a 3 banhos sucessivos de xilol, seguido de banhos com concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90% e 70%). Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina (VETEC 630), lavadas em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em eosina (Sigma E4382) e lavadas em água destilada. A hematoxilina e eosina coram o núcleo da célula com a cor azul arroxeadado e o citoplasma celular e a matriz extracelular em tons avermelhados a róseos. Em seguida as amostras foram submetidas a banhos com concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 90% e 100%) e 3 banhos consecutivos de xilol. No momento seguinte, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck Millipore, Alemanha).

Quantificação da área dos adipócitos:

Para essa análise, foram analisadas oito imagens de diferentes campos para cada animal, em um total de quatro animais por grupo experimental. Em cada campo analisamos cinco adipócitos, nos quais medimos o menor e o maior diâmetro para calcular a área dos adipócitos conforme descrito por Osman (2013). Para cada adipócito, o diâmetro foi calculado como a média aritmética do menor e do maior diâmetro.

## Imunohistoquímica

Para análise imunohistoquímica das amostras, utilizamos a técnica da avidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE; FANGER, 1981). As lâminas foram imersas em banhos decrescentes com álcool etílico 100%, 90% e 70%. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram submersas em tampão de Tris-EDTA pH 9.0. Após esse processo, as lâminas foram colocadas em tampão citrato de sódio pH 6,0. Os cortes foram lavados com 2 banhos de PBS-T por 5 minutos cada e incubadas com PBS/albumina sérica bovina a 3% por 1 hora para que ocorresse o bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, foi feita a incubação overnight à 4°C dos tecidos com o anticorpo primário específico UCP1 (1:500 Sigma U6382). No dia seguinte, foi realizada a incubação com anticorpo secundário, conjugado com biotina (SPD-060 - Spring Bioscience, EUA) e posteriormente com estreptavidina (SPD-060 - Spring Bioscience, EUA). Após a lavagem com PBS-T, foi aplicado diaminobenzidina (DAB) (SPD-060 - Spring Bioscience, EUA) em cada corte. A reação foi interrompida com água destilada. O material foi contra-corado com hematoxilina e as amostras foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan (Merck Millipore, Alemanha).

## Análise qualitativa de UCP1

A UCP-1 é expressa exclusivamente em BAT em roedores e em recém-nascidos, onde é regulada por noradrenalina e hormônios da tireoide. Desta forma, foi realizada uma análise qualitativa da presença ou não de marcação UCP1 no tecido adiposo branco. Onde 0=ausente, 1=pouca marcação, 2=marcação intermediária, 3=muita marcação, como descrito por ZIMMERMANN *et al.*, (2014).

## Western blot

O conteúdo de situína foi avaliado no tecido adiposo retroperitoneal. O conteúdo de proteína ciclofilina foi usado como controle de carregamento. As amostras de RET foram homogeneizadas em tampão de lise (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton 100X, 0,1% SD, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM pirofosfato de sódio, 1 mM ortovanadato de sódio), contendo um coquetel inibidor de protease (Roche®). Após a centrifugação (1.500×g, 10 min at 4 °C), o conteúdo total de proteína do sobrenadante foi quantificado usando um Kit de Ensaio de Proteína Pierce™ BCA (Thermo Scientific, Rockford, EUA). As amostras foram desnaturadas (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol) e em seguida foram aquecidas a 95°C por 5 min. Para análise das proteínas, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), e transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (Hybond-P 0,45 µm PVDF; Amersham Biosciences, BKM, Inglaterra). As membranas foram incubadas com TBST (solução salina tamponada com tris e polissorbato 20, pH 7,6) contendo 5% de leite em pó desnatado por 90 minutos para bloquear sítios de ligação não específicos. Em seguida, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos primários específicos (Sigma-Aldrich MO, EUA (1:500). As membranas foram lavadas 5X, por 5 min com TBST e incubadas com anticorpos secundários específicos marcados com peroxidase (Invitrogen CA, EUA - Anti-rabbit, (1:10000) por 2 horas em temperatura ambiente. Todas as membranas foram lavadas novamente (5x, 5min) e incubadas com um reagente de detecção de luminógeno (reagente Amersham ECL Prime Western Blotting Detection; Amersham Bioscience. O sinal quimioluminescente foi detectado pelo equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) seguido por análises densitométricas. Foi utilizado amostras de 5 a 7 animais de diferentes ninhadas por grupo experimental. Os dados são expressos como uma porcentagem do grupo controle (definido como 100%).

## Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP). Para análise dos dados, foi feito o teste de normalidade da amostra e, em seguida, o teste de Anova-Two Way com o pós teste de Tukey para múltiplas comparações. Foi adotado como valores

significativos  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prism 8.0 (*Graph Software, Inc., USA*).

### Comitê de ética

Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) em Experimentação Científica do CCS-UFRJ sob o número: 109/17 (anexo 1).

## Resultados e Discussão

**Artigo:** Yerba Mate consumption by ovariectomized rats alters white adipose tissue.

**Autores:** Victor Machado de Mello Andrade, Amanda Fernandes de Moura, Katlen da Costa Chaves, Camilla Pereira Dias da Rocha, Cherley Borba Vieira de Andrade, Isis Hara Trevenzoli, Tania Maria Ortiga-Carvalho, Luciane Cláudia Barcellos, Mário Vaisman, Verônica Pinto Salerno.

**Situação:** Publicado na revista "*Molecular and Cellular Endocrinology*"



## Yerba mate consumption by ovariectomized rats alters white adipose tissue

Victor Machado de Mello Andrade<sup>a</sup>, Amanda Fernandes de Moura<sup>a</sup>, Katlen da Costa Chaves<sup>a</sup>, Camilla Pereira Dias da Rocha<sup>b</sup>, Cherley Borba Vieira de Andrade<sup>b,c</sup>, Isis Hara Trevenzoli<sup>b</sup>, Tania Maria Ortiga-Carvalho<sup>b</sup>, Luciane Cláudia Barcellos<sup>a</sup>, Mário Vaisman<sup>d</sup>, Verônica Pinto Salerno<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biociência do Exercício – Escola de Educação Física e Desporto - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Endocrinologia Médica, Hospital Universitário/UFRJ, Brazil

### ARTICLE INFO

Handling Editor: Carolyn M. Klinge

**Keywords:**  
*Ilex paraguariensis*  
 Ovariectomy  
 Adipose tissue  
 Thermogenesis

### ABSTRACT

**Introduction:** Menopause and post-menopause are characterized by low levels of estrogen that can be associated with the emergence of metabolic diseases. While hormone replacement therapy can alleviate many symptoms, it can also exacerbate other diseases such as breast cancer. In the search for natural alternatives, *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate) has been identified as a potential therapy for the onset of obesity. Here, the effect of MATE consumption on white adipose tissue (WAT) was studied in ovariectomized rats, an animal model for post-menopause hormone loss.

**Methods:** Four groups of animals were used: ovariectomy with MATE (OVX MATE) and without MATE (OVX), as well as sham surgery with MATE (Sham MATE) and without MATE (Sham). MATE was provided by gavage at 1 g/kg of body weight for eight weeks before measuring biochemical parameters in plasma and characterizing WAT morphology.

**Results:** The consumption of Yerba MATE significantly decreased weight gain in ovariectomized rats and presented near control levels of triglycerides, total cholesterol, and LDL. A morphometric analysis of WAT showed a significant decrease in the area occupied by adipocytes in the group that consumed MATE. Finally, MATE consumption increased the UCP1 content in the WAT of the ovariectomized group. Yerba MATE treatment was also associated with higher levels of SIRT1 protein.

**Conclusion:** MATE consumption has a preventive effect on the weight gain observed in ovariectomized rats and potential benefits in naturally avoiding the onset of obesity post menopause.

### 1. Introduction

The increase in life expectancy has led to a larger proportion of elderly women and a greater public health concern regarding the physiological changes related to the menopause and post-menopause. Nearly 40% of women seek treatment to minimize menopause-induced symptoms that include headaches, night sweats, vaginal dryness, and sleep disturbances (Nachtigall, 1998). An important clinical feature of menopause is the decline in ovarian produced hormones such as estrogen (Maltais et al., 2009), which is associated with several physiological changes such as increased risk of atherosclerosis (Schillaci et al., 1998),

diabetes mellitus (Zois et al., 2009), bone loss (Kemmler et al., 2004), muscle loss (sarcopenia; 6), changes in body composition, altered lipid profiles, fat deposition (Kemmler et al., 2004; Brochu et al., 2009), and elevated inflammatory markers (Pfeilschifter et al., 2002). Together, the menopause caused alterations can lead to a metabolic syndrome characterized by the emergence and combination of at least 3 risk factors such as obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance and hypertension (Carr, 2003; Eckel et al., 2005; Prasad, 2020).

Obesity induced by a reduction of estrogen production can cause systemic inflammation that can compromise mitochondrial functions

\* Corresponding author. School of Physical Education and Sports, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho, 540, Cidade Universitária, CEP: 21941-599, Brazil.

E-mail address: [vpsalerno@yahoo.com.br](mailto:vpsalerno@yahoo.com.br) (V.P. Salerno).

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111881>

Received 4 October 2022; Received in revised form 12 December 2022; Accepted 30 January 2023

Available online 1 February 2023

0303-7207/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

and, consequently, reduce thermogenesis, which plays an important role in energy expenditure to maintain body temperature (Yoneshiro et al., 2011; Alberdi et al., 2013) and is mainly regulated by the sirtuin (SIRT1) pathway (Alberdi et al., 2013). Thermogenesis is believed to be dependent mainly on the activation of uncoupling proteins (UCPs), more specifically UCP1, located in the inner membrane of the mitochondria of brown adipose tissue (BAT). The activity of UCP1 uncouples the proton gradient (H<sup>+</sup>) used for the synthesis of adenosine triphosphate to generate a heat bioproduct (Tabuchi and Sul, 2021). Among the family of uncoupling proteins, UCP2 and UCP3 isoforms are also located in BAT, at lower levels, as well as in lung and muscle tissue although they do not appear to play an effective role in thermogenesis (Pohl et al., 2019). White adipose tissue (WAT) normally functions in whole-body metabolism and not thermoregulation (Heinonen et al., 2020). However, when the body is subjected to extreme situations (e.g., cold exposure), some WAT cells may undergo a process known as “browning”, which makes WAT cells phenotypically more like classic adipocytes in BAT with a higher of mitochondria and UCP1 (Bartelt and Heeren, 2014).

Currently, estrogen treatment is available for women who have menopause induced symptoms. However, known collateral effects of estrogen therapy include an increased risk for stroke, heart attack, blood clots and cancer (Marjoribanks et al., 2017; Ettinger et al., 2018; Mattar et al., 2008). To develop alternative, non-hormonal strategies to minimize deleterious metabolic effects, the scientific community has focused on the use of natural products that show promise to regulate lipid metabolism, satiety, adipogenesis and thermogenic effects (Lee et al., 2016; Madak-Erdogan et al., 2016; Tardivo et al., 2015), which may be repurposed for use in patients with metabolic syndromes caused by menopause. Recent interest has been emerging in an herb widely consumed mainly in South America, *Ilex paraguariensis* or yerba MATE (MATE) due to its known antioxidant (Matsumoto et al., 2009; Leonard et al., 2010) and cardioprotection effect (Cahuê et al., 2017). In addition, it is a potent modulating agent of energy metabolism that influences both glucose and lipid oxidation (Resende et al., 2012; Silva et al., 2011), which may explain its impact on adipogenesis and effectiveness as an effective adjuvant in weight loss (Gambero and Ribeiro, 2015). The adaptogenic effects of *Ilex paraguariensis* as an antioxidant agent and modulator of energy metabolism are closely linked to some of its components, namely, polyphenols, saponins and methylxanthines (Resende et al., 2012; Gosmann et al., 2012).

Although the literature demonstrates the improvement of energy metabolism in rats and humans treated with yerba MATE, there are few data available that evaluate the influence of this herb on the systemic changes resulting from menopause, specifically on adipose tissue, which is the main objective of this study. Here, we tested the effects of yerba MATE consumption in ovariectomized rats, a known model for estrogen depletion (Idris, 2012), and a significant reduction in weight gain was observed. Further analysis of the white adipose tissue showed that ingestion of MATE prevented adipogenesis as well as induced the browning process and the potential for thermogenesis.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Female Wistar rats (N = 28, 4 weeks old), were kept at a controlled temperature condition (24 ± 1 °C) under an inverted light-dark cycle of 12 h h with access to food and water *ad libitum*. Standard chow for laboratory animals was obtained from BIOBASE (SC, Brazil). Animals were housed in collective cages with a maximum of 4 animals/cage in the animal experimentation facility of the Exercise Biology Laboratory at Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Animal use for experimentation was approved by the Ethics Committee for the use of animals (CEUA) in Scientific Experimentation of the Centro de Ciências da Saúde (CCS-UFRJ) (Number: 109/17).

### 2.2. Ovariectomy

A bilateral ovariectomy was performed on female rats (200–250 g) anesthetized with ketamine (0.5 mL/kg) and xylazine (0.125 mL/kg) by intraperitoneal injection. The peritoneal cavity was accessed by a single incision to expose the uterine tubules. After removal of the ovaries, the peritoneal cavity was sutured and cleaned. The animals in the sham group underwent a simulated surgery, with an incision and exposure of the uterine tubules without removing the ovaries. All animals received the analgesia Dipyrone (200 mg/kg) for 7 days. Experimentation started after a total of 15 days of recovery.

### 2.3. Experimental design

Animals were assigned into 4 groups: simulated surgery (sham, n = 6), simulated surgery with MATE (sham + MATE, n = 6), ovariectomized rats (OVX, n = 8) and ovariectomized rats with MATE (OVX + MATE, n = 8). MATE consisted of a commercial, lyophilized soluble powder (MATE Leão soluble). Each animal received 1 ml of Yerba mate (1 g/kg of animal body weight) diluted into water based on the dosage suggested by other studies (dos Santos et al., 2018; Rocha et al., 2021). After the recovery period, MATE was introduced by oral gavage 5 times per week for 8 weeks. Body weight was measured once a week. Food consumption was evaluated for 24 h in the eighth week of the experiment. After euthanasia, retroperitoneal white adipose tissue (rWAT), uterus, liver and BAT were collected. rWAT was weighed and fixed in 4% paraformaldehyde. A 5 mL sample of blood was collected in a heparinized tube, centrifuged (1,800×g, 15 min, 4 °C) and the plasma was aliquoted and stored at –80 °C for further analysis.

### 2.4. Quantification of white adipose tissue

Retroperitoneal white adipose tissue was quantified by its value in grams. Tissue collection from all animals was performed by the same person on the day of euthanasia.

### 2.5. Lipid profile

Serum concentrations of total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and high-density lipoprotein (HDL) were performed using a commercial kit (Bioclin, MG, Brazil) following manufacturer protocols.

### 2.6. Hormonal quantification

Serum concentrations of insulin and adiponectin were measured using an ELISA kit (FineTest, Wuhan, China).

### 2.7. Tissue sectioning

White adipose tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and subjected to histological processing with increasing series of 70% and 90% ethyl alcohol (Isosfar, Brazil) for 40 min and 2 baths of 100% for 1 h each, afterwards, the clarification step took place with 3 baths of xylene (Isosfar, Brazil) for 20 min each, being submitted to 2 baths of paraffin for 50 min each. At the end of the last bath, the samples were included in the Leica EG1150 H inclusion center (Leica Biosystems, USA). Finally, the tissues were cut on a Rotatory Microtome CUT 5062 microtome (Slee Medical GMBH, Germany) in staggered 5 µm thick slices, for subsequent staining with hematoxylin and eosin and analysis by immunohistochemistry.

#### 2.7.1. H&E staining

Tissue was clarified in 3 successive baths of xylene followed by baths with decreasing concentrations of ethyl alcohol (100%, 90% and 70%). Slices were stained with hematoxylin (VETEC 630) and eosin (Sigma E4382) to mark the cell nucleus purplish-blue color and red to pink for

the cell cytoplasm and extracellular matrix. After washes in distilled water, the slices were subjected to baths with increasing concentrations of ethyl alcohol (70%, 90% and 100%) and 3 consecutive baths of xylene. Next, the slides were mounted with Entellan (Merck Millipore, Germany). Microscope images were captured on a high-resolution camera Olympus DP72 (Olympus Corporation, Japan) attached to the Olympus BX53 microscope (Olympus Corporation, Japan). The area of adipocytes was analyzed in eight images of different fields for sections from each animal ( $n = 4/\text{group}$ ). Five adipocytes were measured for the smallest and largest diameter to calculate the area of adipocytes as previously described (Osman et al., 2013). For each adipocyte, the diameter was calculated as the arithmetic mean of the smallest and largest diameter.

## 2.8. Immunohistochemistry

A previously described avidin-biotin-peroxidase technique was used for an immunohistochemical analysis of the samples (Berti et al., 1983). Slides were immersed in decreasing baths with 100%, 90% and 70% ethyl alcohol before blocking endogenous peroxidase with a 30 min incubation in 3% hydrogen. Antigen was retrieved by submersion in Tris-EDTA (pH 9.0) buffer followed by sodium citrate buffer (pH 6.0). The sections were washed 2 times for 5 min in PBS-T and blocked in PBS with 3% bovine serum albumin for 1h. Next, tissues were incubated overnight at 4 °C with the specific primary antibody UCP1 (1:500, Sigma U6382), washed 3 times for 5 min in PBS-T, incubated with secondary antibody conjugated with biotin (SPD-060 – Spring Bioscience, USA), washed 3 times for 5 min in PBS-T, and incubated with streptavidin (SPD-060 - Spring Bioscience, USA). After washing with PBS-T, antibody was revealed by the enzymatic reaction with the substrate diaminobenzidine (DAB) (SPD-060 - Spring Bioscience, USA). Reactions were stopped with distilled water and tissues were counterstained with hematoxylin before dehydration, diaphanization and mounting with Entellan (Merck Millipore, Germany). A qualitative analysis for the presence or absence of UCP1 labeling in white adipose tissue was performed on a scale of 0–4 with 0 = no labeling, 1 = low labeling, 2 = intermediate labeling, 3 = high labeling.

## 2.9. Western blot

The sirtuin 1 (SIRT1) protein content was evaluated in retroperitoneal white adipose tissue by western blotting. Cyclophilin content was used as loading control. The rWAT samples were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton 100X, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate) containing a protease inhibitor cocktail (cOmplete, Roche®). After a centrifugation (1.500×g, 10 min at 4 °C), the supernatant was removed and its total protein content quantified using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA). Samples were prepared into loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) and heated at 95 °C for 5 min. Protein content was separated by SDS-PAGE (12%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Hybond-P 0.45 μm PVDF; Amersham Biosciences, BKM, England). Membranes were blocked with T-TBS containing 5% nonfat dry milk for 90 min before an overnight incubation at 4 °C with specific primary antibodies (SIRT1: Sigma-Aldrich MO, USA, 1:500; Cyclophilin: Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific MA, USA, 1:5000). Membranes were washed and incubated with peroxidase labeled specific secondary antibodies (Invitrogen CA, USA - Anti-rabbit, 1:10000) for 2h at room temperature. All membranes were washed again and incubated with a luminogen detection reagent (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection reagent; Amersham Bioscience). Chemiluminescence was imaged by ImageQuant LAS 4000 equipment (GE Healthcare Life Sciences) by densitometric analyses. Samples of 5–7 animals from different litters per experimental group was used. Data are expressed as

a percentage of the control group (set at 100%).

## 2.10. Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation (SD). For data analysis, the sample normality test was performed, followed by the Anova-Two Way test with post-hoc Tukey's Multiple Comparison test. Significance was considered with a  $p < 0.05$ . All statistical analyzes were performed using the Prism 8.0 program (Graph Software, Inc., USA).

## 3. Results

### 3.1. Yerba MATE reduced weight gain induced by ovariectomy

The OVX group showed a significant increase in body weight gain in relation to all experimental groups ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 1A). The combination of ovariectomy with MATE treatment significantly reduced the body weight gain compared to the untreated OVX ( $P < 0.02$ ) (Fig. 1A). The same result can be observed in Fig. 1B, which shows the Area Under the Curve (AUC) of Fig. 1A. The weight of white adipose tissue (Fig. 1C) and liver (Fig. 1D) showed no difference between the Sham, Sham MATE and OVX MATE groups. However, the OVX group showed a significant increase in these parameters compared to the sham groups ( $P < 0.001$ ) and a tendency ( $P = 0.07$ ) to increase when compared to the OVX MATE. The weight of brown adipose tissue displayed no statistical difference between the groups (Fig. 1E). Food intake was also analyzed (Fig. 1F), but there was no statistical difference between the groups. To evaluate the effectiveness of the ovariectomy surgery, each uterus was weighed after euthanasia and Fig. 1G shows that the ovariectomized rats had an atrophied uterus ( $P < 0.001$ ) in relation to the rats that had their ovaries intact (Sham groups).

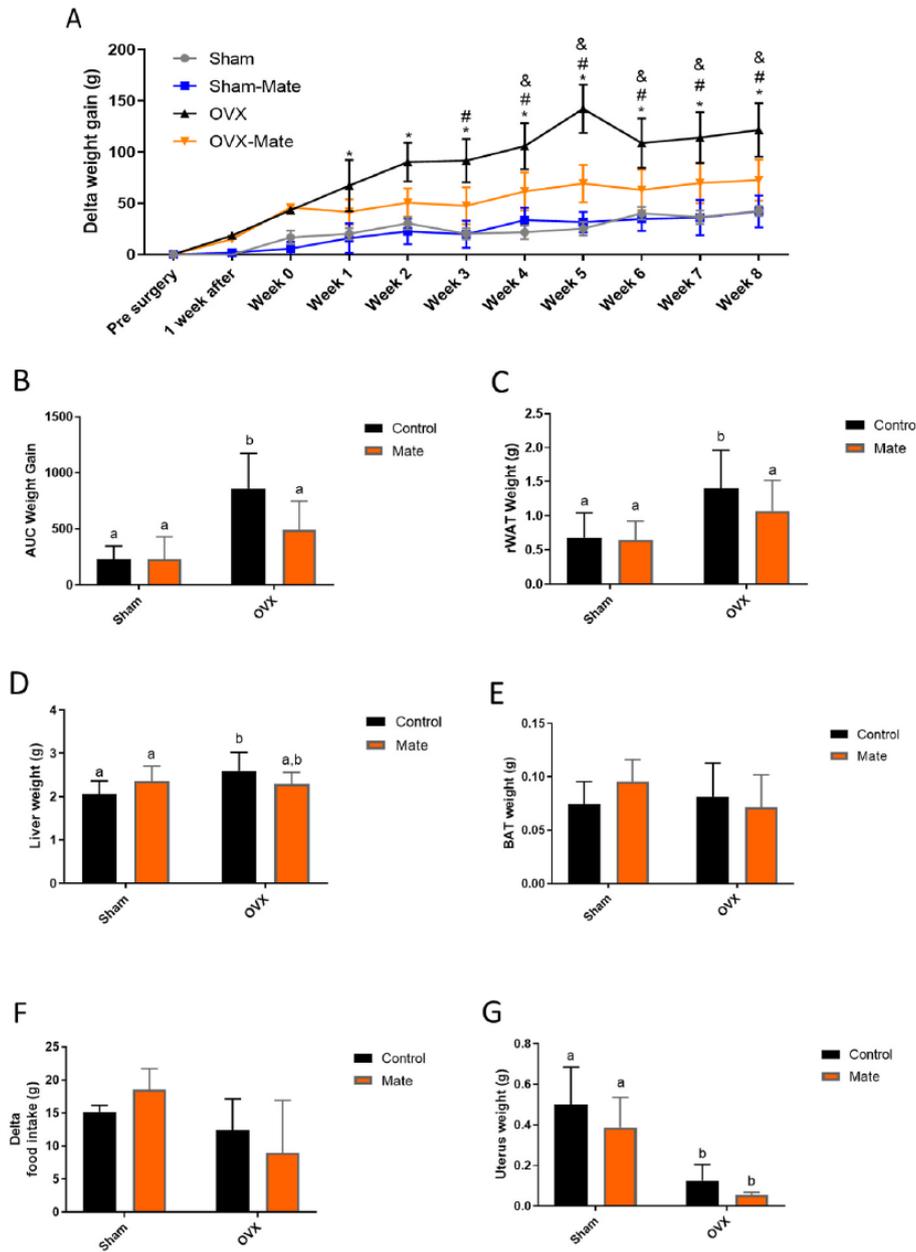
### 3.2. Limited effects of yerba MATE on plasma markers

When analyzing the plasma obtained from the experimental groups (Fig. 2), we did not observe a statistical difference in the concentrations of triglycerides (Fig. 2A). A tendency ( $P = 0.08$ ) of increase in OVX in relation to OVX MATE was seen. In total cholesterol values (Fig. 2B), we did not observe differences between the Sham, Sham MATE and OVX MATE groups. In contrast, the total cholesterol values in the OVX group were significantly higher compared to the sham groups ( $P < 0.05$ ). No statistical difference was observed in the concentrations of HDL (Fig. 2C), LDL (Fig. 2D) and insulin (Fig. 2E). Glucose tolerance test was not different between the groups analyzed (Fig. 2G; Fig. 2H). However, when analyzing the concentrations of adiponectin (Fig. 2F), a significant increase was observed in the OVX group when compared to the sham group ( $P < 0.05$ ).

### 3.3. Beneficial effects of yerba MATE on white adipose tissue

Adipose cells of OVX group showed a greater hypertrophy in comparison to the other experimental groups ( $P < 0.01$ ; Fig. 3E). OVX group showed a significant reduction in the number of cells in the image compared to OVX-MATE, Sham-MATE and Sham ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 3F). Interesting, OVX-MATE shows a significant increase in the hyperplasia of rWAT cells compared to the control Sham and OVX ( $P < 0.05$  and  $P < 0.0001$ , respectively) (Fig. 3F). In view of these data, we considered if the browning process could be taking place. For this, we evaluated the UCP1 protein in the WAT (Fig. 4). The OVX-MATE group had a significant increase in UCP-1 labeling compared to the other experimental groups ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4E).

To assess mitochondrial biogenesis, the SIRT-1 content was analyzed in white adipose tissue (Fig. 5). Sham-MATE and OVX-MATE had a tendency ( $P = 0.063$ ;  $P = 0.069$ , respectively) to increase the content of this protein in relation to their controls. In addition, the two-way ANOVA showed a significant increase ( $P = 0.025$ ) for the treatment



**Fig. 1.** – Body and organ weight along with feeding habits of control and ovariectomized rats submitted to treatment with *Ilex paraguariensis* (yerba MATE). (A) Graphical representation of the weekly weight change. (\*) indicates significant difference between OVX vs Sham and Sham MATE; (#) indicates significant difference between OVX vs OVX MATE; (&) indicates significant difference between OVX MATE vs Sham and Sham MATE. (B) Area under the curve of the weight gain represented in figure A. Final organ weights of (C) retroperitoneal white adipose tissue (rWAT), (D) liver and (E) brown adipose tissue (BAT). (F) The delta of food consumption evaluated over the last 24h. (G) Weight of the uterus. Different letters indicate significant difference. N = 6–8 for each experimental group.

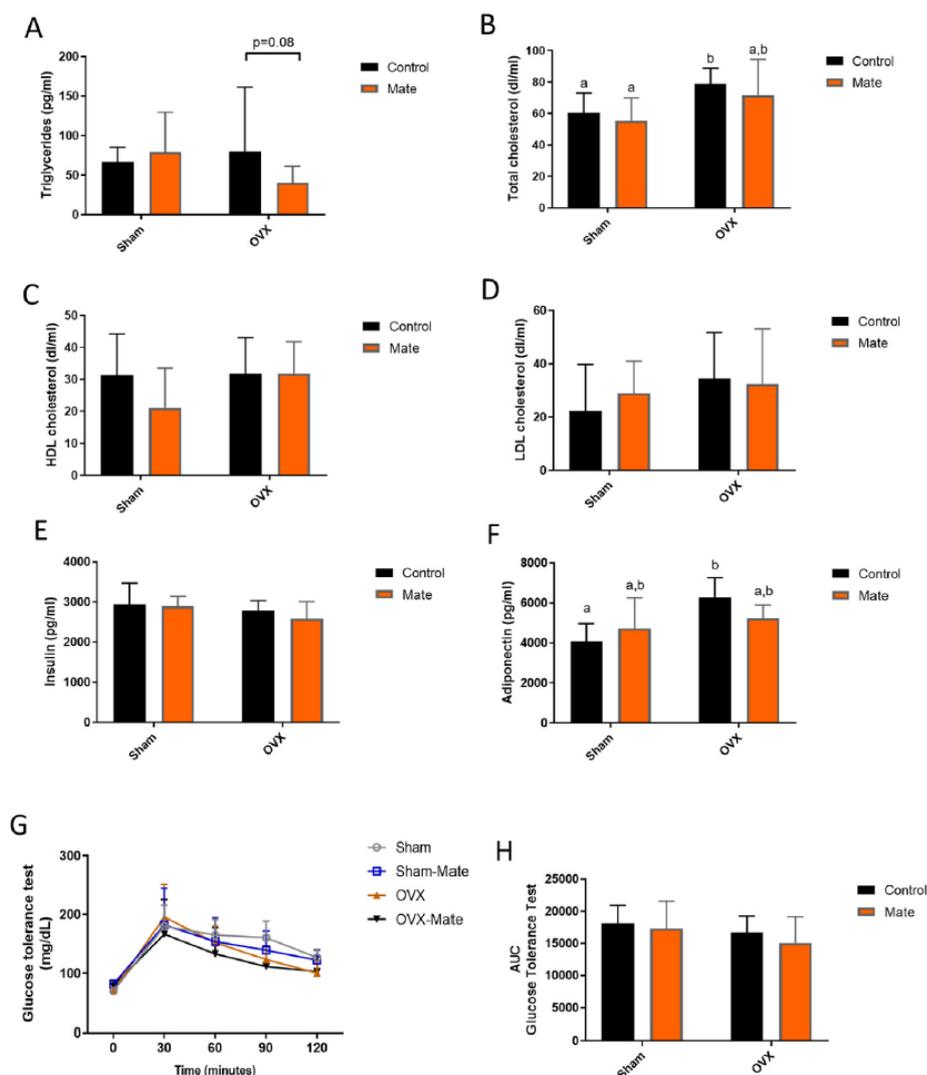
factor (MATE).

**4. Discussion**

A previous study in male animals noted a reduction in weight gain that was associated with MATE ingestion (Silva et al., 2011). Here, we have extended this observation to ovariectomized rats, a model system for post menopause. The data shows that treatment with MATE reduced body weight gain as early as the third week of treatment. As the reduction in weight gain may be associated with less fat accumulation in WAT, rWAT was quantified and showed a significant reduction in OVX rats treated with MATE when compared to control animals. Yerba mate has been shown to reduce weight gain and body fat in studies that induced obesity by a high-calorie diet in male rats (Valença et al., 2022; Rocha et al., 2018; Choi et al., 2017; Gan et al., 2018). However, only the study by Rocha et al. (2021) showed such effects in female animals with reduced female hormone levels (e.g., post menopause), which support the results found in our study. In addition, for the first time we

showed that MATE consumption in ovariectomized rats alters the histological characteristics of white adipose tissue. Despite few studies with MATE in these conditions, it is possible that this is a natural alternative to hormone replacement therapy.

To corroborate these findings, we performed histology on rWAT and evaluated the cell morphology. The OVX group showed a highly significant hypertrophic morphology in adipocytes that was represented by the reduction in the number of cells in the observed area. In contrast, the OVX group that consumed yerba MATE consistently had a preserved adipocyte size, like the control group (Sham). Although there are no studies showing such results in an ovariectomy model, Valença et al. (Gosmann et al., 2012) observed that after 12 weeks of treatment, mice that consumed a high fat diet associated with MATE showed a significant reduction in the cross-sectional area of adipocytes in relation to mice that did not consume MATE. Some studies have shown that these adaptations may be associated with the high content of polyphenols, such as quercetin, rutin, chlorogenic acid and caffeine in MATE (Choi et al., 2017; Gan et al., 2018). Gosmann et al. (2012) verified the effectiveness



**Fig. 2.** - Plasma markers from normal and ovariectomized rats submitted to treatment with *Ilex paraguariensis* (yerba MATE). (A) Trend ( $p = 0.08$ ) of increase in triglycerides in the OVX vs OVX-MATE group. Serum levels of (B) total cholesterol, (C) HDL, (D) LDL, (E) insulin, and (F) adiponectin. (G) Glucose tolerance test and its area under the curve (H). Different letters indicate significant difference.  $n = 6-8$  for each experimental group.

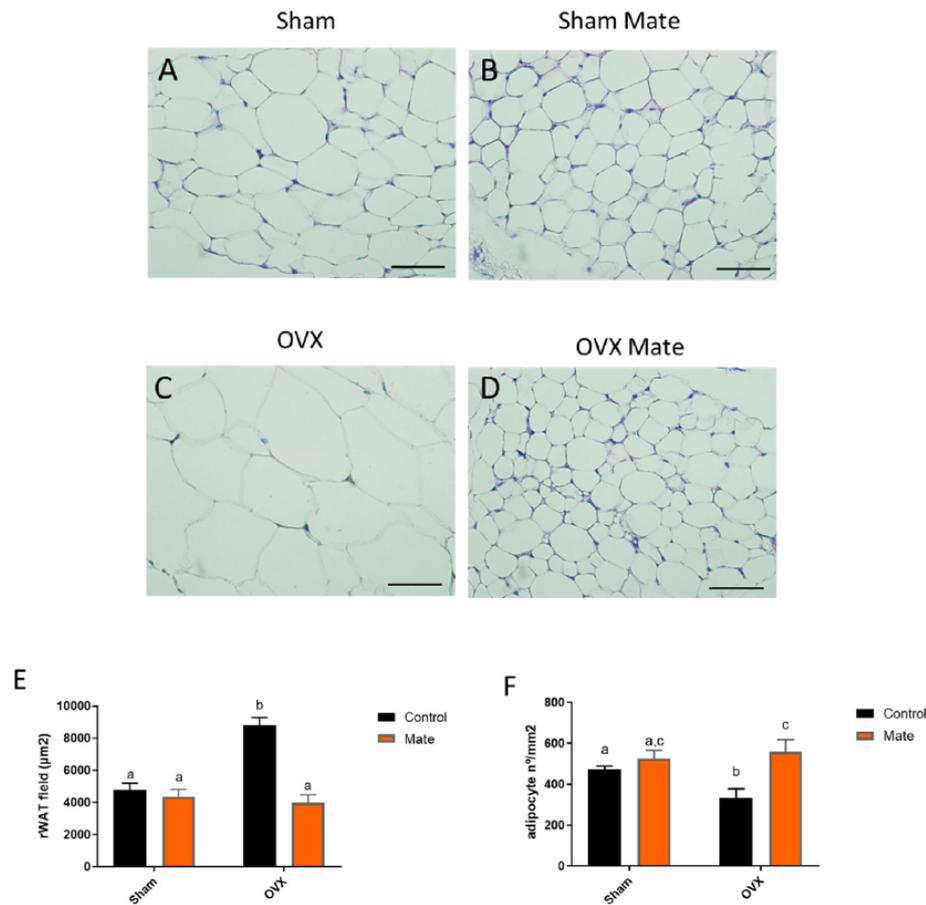
of each MATE compound in inhibiting pre-adipocytes in mature adipocytes, with rutin and chlorogenic acid being the agents with the greatest anti-adipogenic effects.

The reduction of ovarian hormones is associated with the risk of developing metabolic and cardiovascular diseases (Ko and Kim, 2020). Contrary to our initial hypothesis, we did not observe any statistical difference between the groups by analysis of the glucose tolerance tests neither in serum insulin concentration. The study by Rocha et al. (2021), also did not observe any difference in these parameters. In line with the previous authors, our experiment covered 8 weeks and it may be possible that this is not sufficient time to generate changes in these parameters. The measurements of LDL, HDL, and total cholesterol also showed no difference between the groups. Utilizing blood metabolic parameters, triglycerides did not present a statistically significant difference. However, a tendency ( $P = 0.08$ ) of an increase was observed only for the untreated OVX group. Despite being a trend, this result corresponds with the morphometric findings of white adipose tissue described above. Furthermore, the literature also shows that estrogen deficiency induced by menopause can also lead to disorders in lipid metabolism, increasing serum triglycerides (Ko and Kim, 2020). Further studies of longer duration will be needed with this model system.

In contrast, we observed a significant increase in the levels of

adiponectin hormone in the OVX group compared to the sham group. This hormone has a protective role against metabolic syndromes through sensitization of insulin receptors and anti-inflammatory effect on adipose tissue (Lihn et al., 2005). A possible explanation is a positive correlation between adiponectin and follicle-stimulating hormone (FSH) with consequent and gradual increases in its production in response to the endogenous estrogen reduction (Lee et al., 2022). As there is an increase in FSH during menopause, it could lead to changes in the adiponectin hormone. It has been reported that the increased production of FSH in the face of estrogen decline appears to be temporary (Shaw et al., 2009) and overall the literature is still inconclusive on this issue (Khosla et al., 1998). More studies are still needed to better elucidate this topic.

Adipose tissue can be divided into two main types: white adipose tissue (WAT), which is the main storage site for energy, and brown adipose tissue (BAT), which stores lower levels of fat and can be activated to oxidize fatty acids to maintain body temperature (Ikeda et al., 2018). The use of fat in BAT is faster and simpler, due to its high content of mitochondria and its thermogenesis function (Frigolet and Gutiérrez-Aguilar, 2020; Kuryłowicz and Puzianowska-Kuźnicka, 2020). The concept of “browning” consists of darkening some WAT cells, leaving them with a beige hue. These cells are phenotypically like classic brown adipocytes in BAT, having many mitochondria and uncoupling proteins



**Fig. 3.** - Histology of retroperitoneal adipose tissue from normal and ovariectomized rats submitted to treatment with *Ilex paraguariensis* (yerba MATE). Image (A) shows the histology of Sham group. (B) Sham Mate. (C) OVX. (D) OVX Mate. Graph (E) shows the hypertrophy (size) of adipocytes and graph (F) shows the hyperplasia (quantity) in a given area of tissue. Different letters indicate significant difference.  $n = 3-6$  for each experimental group. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

(UCP1). It is important to highlight that UCP1 is mainly expressed in brown adipocytes and plays a fundamental role in thermogenesis (Chouchani et al., 2019). This protein uncouples the ATP synthase complex and transforms energy into heat. Evidence suggests that beige adipocytes have remarkable amounts of UCP1 (Kalinovich et al., 2017). This factor has attracted a lot of attention from the scientific community in relation to its thermogenic effect and the fight against obesity. Nonetheless, Kalinovich et al. (2017), showed that the thermogenic capacity of beige adipocytes corresponds to approximately 20% of brown adipocytes. Despite this, several studies have been carried out showing WAT darkening as a promising strategy in the fight against metabolic diseases (Kaisanlahti and Glumoff, 2019; Kusminski et al., 2016; Lizcano, 2019; Castro et al., 2017).

Since the reduction of female hormones negatively alters the accumulation of fat, and the ingestion of yerba MATE plays a protective role against this alteration, we postulated that MATE could modify the characteristics of white adipose cells and transforming them into adipocyte-like cells brown, a process known as “browning” (Khosla et al., 1998). When the UCP1 content was evaluated in the rWAT by immunohistochemistry, the ovariectomized group that consumed MATE showed more UCP1 than the other groups, suggesting a process of browning in this group. The study by dos Santos et al. (Valença et al., 2022) also showed an increase in UCP1 with MATE ingestion, although the analysis was on brown adipose tissue of male rats that consumed a high fat diet. This is the first study showing that MATE could be increasing WAT thermogenesis through a higher UCP1 content, even over ovarian hormone deficiency and a normal diet. However, it is important to emphasize that the UCP1 levels only show the thermogenic

capacity of a tissue and does not necessarily reflect its activity (Castro et al., 2017). More studies are needed to evaluate the activity of UCP1 by analyzing sympathetic stimulations such as norepinephrine in WAT, lipolysis and fatty acid metabolism, in addition to heat production. Thus, it is possible to accurately state the activation of thermogenesis and its contribution to energy balance.

One way to stimulate BAT activity and white adipose tissue darkening is through the activation of the Sirt-1 pathway. This protein can be activated by dietary compounds, caloric restriction, or physical exercise, promoting mitochondrial biogenesis, and improving its functionality (Gan et al., 2018; Burris et al., 2012). The browning process is also promoted by SIRT1 through the deacetylation of the PPAR $\gamma$  protein, which generates an activation cascade of downstream proteins, promoting the differentiation of brown/beige adipocytes (Qiang et al., 2012). When evaluated, the SIRT1 content in the retroperitoneal WAT tended to increase for the two groups that consumed mate compared to their control groups (Sham-Mate:  $P = 0.063$ ; OVX-Mate:  $P = 0.069$ ). When the treatment factor was analyzed, a statistically significant difference was observable. It is plausible that MATE compounds may be activating the SIRT1 pathway, thus generating the darkening of white adipose tissue. Darkening of WAT increases thermogenesis at the expenses of increasing UCP1 and therefore MATE could be decreasing fat accumulation by exerting an anti-obesity role in the absence of female hormones. Future studies need to be carried out evaluating longer ovariectomy and to identify downstream proteins of the SIRT1 pathway.

While it was not possible to evaluate the estrogen hormone, the measurements of uterine weight served as a positive control for the expected effects of an ovariectomy. Another limitation was the low

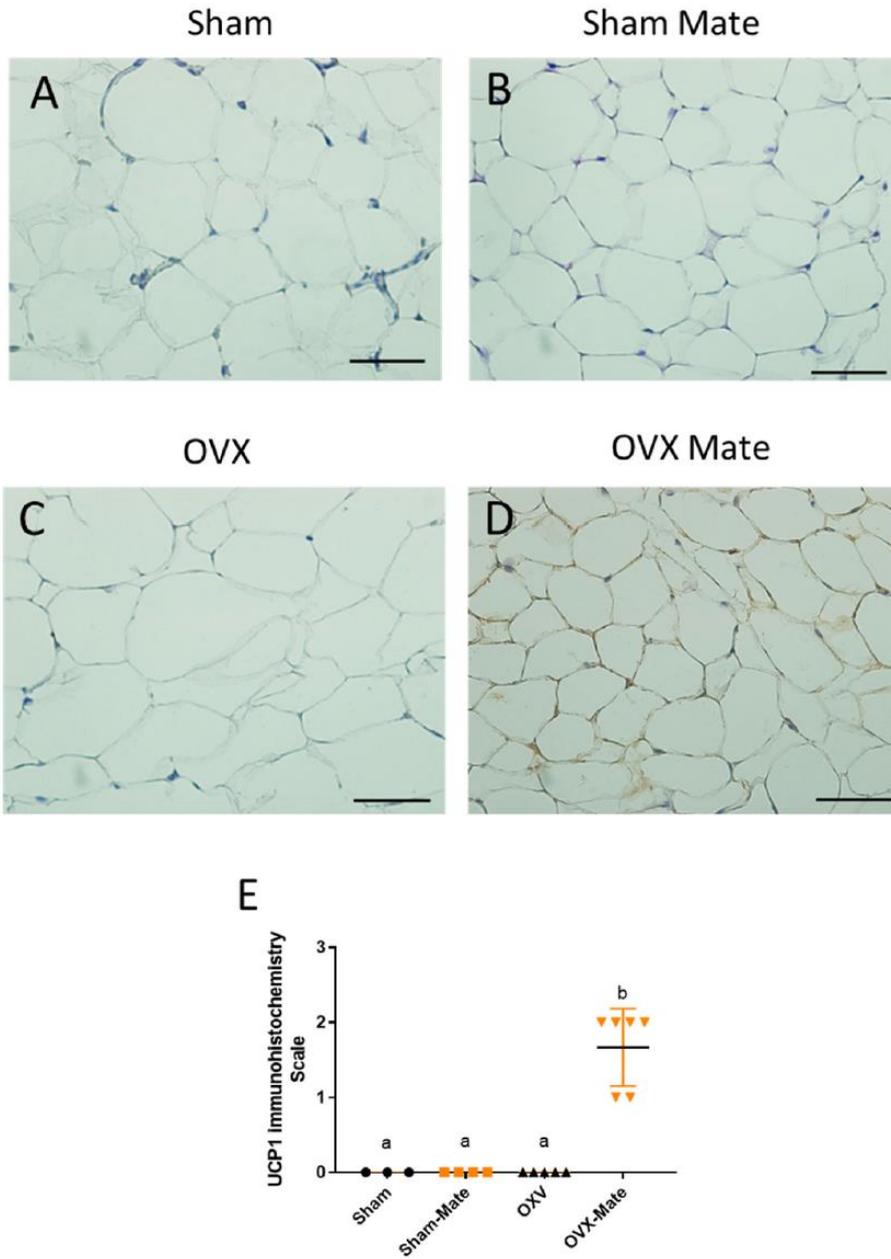


Fig. 4. - Immunohistochemistry of UCP1 protein in retroperitoneal adipose tissue from normal and ovariectomized rats submitted to treatment with *Ilex paraguariensis* (yerba MATE). The brown color represents the amount of UCP1 protein in the tissue. Image (A) represents sham group. (B) Sham Mate group. (C) OVX group. (D) OVX Mate group. Graph (E) is a qualitative analysis for the presence or absence of UCP1 labeling in white adipose tissue was performed on a scale of 0–4. Different letters indicate significant difference. n = 3–6 for each experimental group. Scale bar: 50 μm.

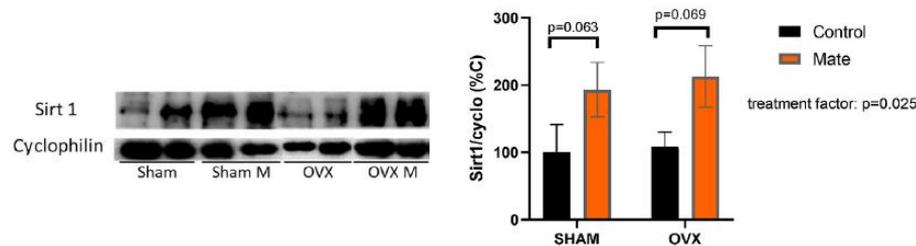


Fig. 5. - Western blot of SIRT1 protein in retroperitoneal adipose tissue from normal and ovariectomized rats submitted to treatment with *Ilex paraguariensis* (yerba MATE). n = 4–6 for each experimental group.

number of animals (n = 3) in the Sham group for the histological and immunohistology analysis as there was a loss of samples during processing. However, the results clearly show that the ingestion of MATE by animals with a low production of ovarian hormones (e.g., menopause)

reduces weight gain through less fat accumulation. This coincides with an increase in SIRT1 protein that could increase the UCP1 content in mitochondria and possibly lead to thermogenesis in white adipose tissue. While further studies are needed to confirm this, our observations

suggest that Yerba mate could provide an alternative, natural strategy for the prevention and therapeutic control of energy imbalances in women with low estrogen production such as menopause and post menopause by positively modulating WAT metabolism.

#### CRedit authorship contribution statement

**Victor Machado de Mello Andrade:** Designed the study, performed the experiments, Formal analysis, analyzed the study, Writing – original draft, drafted the manuscript. **Amanda Fernandes de Moura:** Performed the experiments. **Katlen da Costa Chaves:** Performed the experiments. **Camilla Pereira Dias da Rocha:** Performed the experiments, reviewed and proofread the manuscript. **Cherley Borba Vieira de Andrade:** Performed the experiments, reviewed and proofread the manuscript. **Isis Hara Trevenzoli:** Funding acquisition, reviewed and proofread the manuscript. **Tania Maria Ortiga-Carvalho:** Funding acquisition, reviewed and proofread the manuscript. **Luciane Cláudia Barcellos:** Designed the study, interpreted results of the experiments, Funding acquisition, reviewed and proofread the manuscript. **Mário Vaisman:** Funding acquisition, reviewed and proofread the manuscript. **Verônica Pinto Salerno:** Designed the study, interpreted results of the experiments, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

#### Declaration of competing interest

The authors have no conflict of interest.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgments

Careful attention to the English in the manuscript was provided by Dr. D. William Provance, Jr. during revision. Financial support was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

#### References

- Alberdi, G., Rodríguez, V.M., Miranda, J., Macarulla, M.T., Churrua, I., Portillo, M.P., 2013. Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. *Food Chem.* 141 (2), 1530–1535.
- Bartelt, A., Heeren, J., 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (1), 24–36.
- Berti, E., Monti, M., Cavicchini, S., Caputo, R., 1983. The avidin-biotin peroxidase complex (ABCpx)/in skin immunoelectron microscopy. *Arch. Dermatol.* 119 (2), 134–138.
- Brochu, M., Malita, M.F., Messier, V., Doucet, E., Strychar, I., Lavoie, J.M., et al., 2009. Resistance training does not contribute to improving the metabolic profile after a 6-month weight loss program in overweight and obese postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (9), 3226–3233.
- Burris, K.P., Harte, F.M., Michael Davidson, P., Neal Stewart Jr., C., Zivanovic, S., 2012. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): a review. *Chil. J. Agric. Res.* 72 (2), 268–275.
- Cahuê, F., Souza, S., Dos Santos, C.F.M., Machado, V., Nascimento, J.H.M., Barcellos, L., et al., 2017. Short-term consumption of *Ilex paraguariensis* extracts protects isolated hearts from ischemia/reperfusion injury and contradicts exercise-mediated cardioprotection. *Appl. Physiol. Nutr. Metabol.* 42 (11), 1149–1157.
- Carr, M.C., 2003. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (6), 2404–2411.
- Castro, É., Silva, T.E.O., Festuccia, W.T., 2017. Critical review of beige adipocyte thermogenic activation and contribution to whole-body energy expenditure. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* (2), 31/j/hmbci.2017.31.issue-2/hmbci-2017-0042/hmbci-2017-0042.xml.
- Choi, M.S., Park, H.J., Kim, S.R., Kim, D.Y., Jung, U.J., 2017. Long-Term dietary supplementation with yerba mate ameliorates diet-induced obesity and metabolic disorders in mice by regulating energy expenditure and lipid metabolism. *J. Med. Food* 20 (12), 1168–1175.

- Chouchani, E.T., Kazak, L., Spiegelman, B.M., 2019. New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond. *Cell Metabol.* 29 (1), 27–37.
- dos Santos, T.W., Miranda, J., Teixeira, L., Aiausti, A., Matheu, A., Gambero, A., et al., 2018. Yerba mate stimulates mitochondrial biogenesis and thermogenesis in high-fat-diet-induced obese mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 62 (15), 1800142.
- Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., 2005. The metabolic syndrome. *Lancet* 365 (9468), 1415–1428.
- Ettinger, B., Quesenberry, C., Schroeder, D.A., Friedman, G., 2018. Long-term postmenopausal estrogen therapy may be associated with increased risk of breast cancer: a cohort study. *Menopause* 25 (11), 1191–1194.
- Frigolet, M.E., Gutiérrez-Aguilar, R., 2020. The colors of adipose tissue. *Gac. Med. Mex.* 156 (2), 142–149.
- Gambero, A., Ribeiro, M., 2015. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. *Nutrients* 7 (2), 730–750.
- Gan, R.Y., Zhang, D., Wang, M., Corke, H., 2018. Health benefits of bioactive compounds from the genus *Ilex*, a source of traditional caffeinated beverages. *Nutrients* 10 (11), E1682.
- Gosmann, G., Barlette, A.G., Dhamer, T., Arçari, D.P., Santos, J.C., de Camargo, E.R., et al., 2012. Phenolic compounds from maté (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Plant Foods Hum. Nutr.* 67 (2), 156–161.
- Heinonen, S., Jokinen, R., Rissanen, A., Pietiläinen, K.H., 2020. White adipose tissue mitochondrial metabolism in health and in obesity. *Obes. Rev.* 21 (2), e12958.
- Idris, A.I., 2012. Ovariectomy/orchidectomy in rodents. *Methods Mol. Biol.* 816, 545–551.
- Ikeda, K., Maretich, P., Kajimura, S., 2018. The common and distinct features of Brown and beige adipocytes. *Trends Endocrinol. Metabol.* 29 (3), 191–200.
- Kaisanlahti, A., Glumoff, T., 2019. Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *J. Physiol. Biochem.* 75 (1), 1–10.
- Kalinovich, A.V., de Jong, J.M.A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2017. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie* 134, 127–137.
- Kemmler, W., Lauber, D., Weineck, J., Hensen, J., Kalender, W., Engelke, K., 2004. Benefits of 2 years of intense exercise on bone density, physical fitness, and blood lipids in early postmenopausal osteopenic women: results of the Erlangen Fitness Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). *Arch. Intern. Med.* 164 (10), 1084–1091.
- Khosla, S., Melton, L.J., Atkinson, E.J., O'Fallon, W.M., Klee, G.G., Riggs, B.L., 1998. Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (7), 2266–2274.
- Ko, S.H., Kim, H.S., 2020. Menopause-associated lipid metabolic disorders and foods beneficial for postmenopausal women. *Nutrients* 12 (1), 202.
- Kurylowicz, A., Puzianowska-Kuznicka, M., 2020. Induction of adipose tissue browning as a strategy to combat obesity. *IJMS* 21 (17), 6241.
- Kusminski, C.M., Bickel, P.E., Scherer, P.E., 2016. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (9), 639–660.
- Lee, H., Choi, J., Shin, S.S., Yoon, M., 2016. Effects of Korean red ginseng (*Panax ginseng*) on obesity and adipose inflammation in ovariectomized mice. *J. Ethnopharmacol.* 178, 229–237.
- Lee, S.W., Hwang, I.S., Jung, G., Kang, H.J., Chung, Y.H., 2022. Relationship between metabolic syndrome and follicle-stimulating hormone in postmenopausal women. *Medicine* 101 (18), e29216.
- Leonard, S.S., Hogans, V.J., Coppes-Petricorena, Z., Peer, C.J., Vining, T.A., Fleming, D. W., et al., 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.
- Lihn, A.S., Pedersen, S.B., Richelsen, B., 2005. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes. Rev.* 6 (1), 13–21.
- Lizcano, F., 2019. The beige adipocyte as a therapy for metabolic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (20), 5058.
- Madak-Erdogan, Z., Gong, P., Zhao, Y.C., Xu, L., Wrobel, K.U., Hartman, J.A., et al., 2016. Dietary licorice root supplementation reduces diet-induced weight gain, lipid deposition, and hepatic steatosis in ovariectomized mice without stimulating reproductive tissues and mammary gland. *Mol. Nutr. Food Res.* 60 (2), 369–380.
- Maltais, M.L., Desroches, J., Dionne, L.J., 2009. Changes in muscle mass and strength after menopause. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 9 (4), 186–197.
- Marjoribanks, J., Farquhar, C., Roberts, H., Lethaby, A., Lee, J., 2017. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, CD004143.
- Matsumoto, R.L.T., Bastos, D.H.M., Mendonça, S., Nunes, V.S., Bartchewsky, W., Ribeiro, M.L., et al., 2009. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *J. Agric. Food Chem.* 57 (5), 1775–1780.
- Mattar, C.N., Harharah, L., Su, L.L., Agarwal, A.A., Wong, P.C., Choolani, M., 2008. Menopause, hormone therapy and cardiovascular and cerebrovascular disease. *Ann. Acad. Med. Singapore* 37 (1), 54–62.
- Nachtigall, L.E., 1998. The symptoms of perimenopause. *Clin. Obstet. Gynecol.* 41 (4), 921–927.
- Osman, O.S., Selway, J.L., Kępczyńska, M.A., Stocker, C.J., O'Dowd, J.F., Cawthorne, M. A., et al., 2013. A novel automated image analysis method for accurate adipocyte quantification. *Adipocyte* 2 (3), 160–164.
- Pfeilschifter, J., Köditz, R., Pfohl, M., Schatz, H., 2002. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr. Rev.* 23 (1), 90–119.
- Pohl, E.E., Rupperecht, A., Macher, G., Hilde, K.E., 2019. Important trends in UCP3 investigation. *Front. Physiol.* 10, 470.
- Prasun, P., 2020. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 1866 (10), 165838.

- Qiang, L., Wang, L., Kon, N., Zhao, W., Lee, S., Zhang, Y., et al., 2012. Brown remodeling of white adipose tissue by Sirt1-dependent deacetylation of ppar $\gamma$ . *Cell* 150 (3), 620–632.
- Resende, P.E. de, Verza, S.G., Kaiser, S., Gomes, L.F., Kucharski, L.C., Ortega, G.G., 2012. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.* 144 (3), 735–740.
- Rocha, D.S., Casagrande, L., Model, J.F.A., Dos Santos, J.T., Hoefel, A.L., Kucharski, L.C., 2018. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.* 105, 370–376.
- Rocha, D.S., Argenta Model, J.F., Von Dentz, M., Maschio, J., Ohlweiler, R., Lima, M.V., et al., 2021. Adipose tissue of female Wistar rats respond to *Ilex paraguariensis* treatment after ovariectomy surgery. *J. Tradit. Complement. Med.* 11 (3), 238–248.
- Schillaci, G., Verdecchia, P., Borgioni, C., Ciucci, A., Porcellati, C., 1998. Early cardiac changes after menopause. *Hypertension* 32 (4), 764–769.
- Shaw, N.D., Srouji, S.S., Histed, S.N., McCurnin, K.E., Hall, J.E., 2009. Aging attenuates the pituitary response to gonadotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (9), 3259–3264.
- Silva, R.D., Bueno, A.L.S., Gallon, C.W., Gomes, L.F., Kaiser, S., Pavei, C., et al., 2011. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. *Fitoterapia* 82 (6), 818–826.
- Tabuchi, C., Sul, H.S., 2021. Signaling pathways regulating thermogenesis. *Front. Endocrinol.* 12, 595020.
- Tardivo, A.P., Nahas-Neto, J., Orsatti, C.L., Dias, F.B., Poloni, P.F., Schmitt, E.B., et al., 2015. Effects of omega-3 on metabolic markers in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Climacteric* 18 (2), 290–298.
- Valença, H. da M., E Silva, C.P., de Brito Gitirana, L., Valença, S.S., Lanzetti, M., 2022. Beneficial effects of *Ilex paraguariensis* in the prevention of obesity-associated metabolic disorders in mice. *Phytother. Res.* 36 (2), 1032–1042.
- Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., et al., 2011. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity* 19 (1), 13–16.
- Zois, C.E., Christos, Z.E., Tokmakidis, S.P., Volaklis, K.A., Kotsa, K., Touvra, A.M., et al., 2009. Lipoprotein profile, glycemic control and physical fitness after strength and aerobic training in post-menopausal women with type 2 diabetes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 106 (6), 901–907.

## **Considerações Finais:**

O presente estudo buscou avaliar os efeitos da erva Mate na modulação do metabolismo de glicose, lipídios, morfologia e termogênese do tecido adiposo branco de ratas Wistar sobre condição de baixa produção dos hormônios ovarianos. Compreender os possíveis efeitos protetores do Mate nessas condições, faz com que possamos aumentar o leque de estratégias para combater a adversidade no metabolismo energético durante e após a menopausa.

Os resultados mostraram que o consumo da erva Mate em ratas ovariectomizadas reduziu o ganho de peso por meio da diminuição do acúmulo de gordura, aumentou o conteúdo de proteínas relacionadas com a termogênese (UCP1 e Sirt1) e preservou o tamanho do adipócitos.

Os resultados deste trabalho mostram uma possível forma de minimizar os efeitos deletérios no metabolismo energético devido a redução da produção dos hormônios ovarianos.

Como aplicações práticas, esse estudo confirma o efeito anti-obesogênico (visto anteriormente na literatura com ratos que consumiam uma dieta hipercalórica) em ratas com déficit de estrogênio. Dessa forma, essa pode ser uma estratégia simples para se utilizar como “escudo” contra os eventuais problemas metabólicos que a menopausa pode trazer.

## **Perspectivas:**

Durante a realização dessa tese, tivemos a ideia de realizar um outro projeto utilizando o exercício físico associado com o Mate, sobre a hipótese de uma maximização do efeito visto no presente estudo. Esse projeto já está sendo desenvolvido no laboratório mas ainda está na fase inicial. No entanto, o grupo piloto mostrou resultados promissores associando essas duas variáveis em ratas ovariectomizadas. Esperamos finalizá-lo em 2024.

## **Referências**

ALDISS, P. et al. Exercise-induced 'browning' of adipose tissues. **Metabolism**, v. 81, p. 63–70, abr. 2018.

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: The Official Journal of the British Dietetic Association**, v. 14, n. 3, p. 243–250, jun. 2001.

ARÇARI, D. P. et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 110–115, 30 mar. 2011.

BASKARAN, P. et al. Capsaicin induces browning of white adipose tissue and counters obesity by activating TRPV1 channel-dependent mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 15, p. 2369–2389, ago. 2016.

BROCHU, M. et al. Resistance training does not contribute to improving the metabolic profile after a 6-month weight loss program in overweight and obese postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3226–3233, set. 2009.

BURRIS, K. P. et al. Composition and Bioactive Properties of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A Review. **Chilean journal of agricultural research**, v. 72, n. 2, p. 268–275, jun. 2012.

CAHUÊ, F. et al. Short-term consumption of *Ilex paraguariensis* extracts protects isolated hearts from ischemia/reperfusion injury and contradicts exercise-mediated cardioprotection. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 42, n. 11, p. 1149–1157, nov. 2017.

CANTÓ, C. et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, v. 458, n. 7241, p. 1056–1060, 23 abr. 2009.

CARR, M. C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2404–2411, jun. 2003.

CERVELLATI, C.; BERGAMINI, C. M. Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 54, n. 5, p. 739–753, maio 2016.

CHEMINET, G. et al. Antioxidant properties and phenolic composition of "Composed Yerba Mate". **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 12, p. 4711–4721, dez. 2021.

CHOI, M.-S. et al. Long-Term Dietary Supplementation with Yerba Mate Ameliorates Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorders in Mice by Regulating Energy Expenditure and Lipid Metabolism. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 12, p. 1168–1175, dez. 2017.

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba Mate ( *Ilex paraguariensis* ) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316–8324, 23 set. 2009.

DOS SANTOS, T. W. et al. Yerba Mate Stimulates Mitochondrial Biogenesis and Thermogenesis in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 15, p. 1800142, ago. 2018.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9468, p. 1415–1428, 16 abr. 2005.

ELLIOTT, K. J.; SALE, C.; CABLE, N. T. Effects of resistance training and detraining on muscle strength and blood lipid profiles in postmenopausal women. **British Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 5, p. 340–344, out. 2002.

ETTINGER, B. et al. Long-term postmenopausal estrogen therapy may be associated with increased risk of breast cancer: a cohort study. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 25, n. 11, p. 1191–1194, nov. 2018.

FEDORENKO, A.; LISHKO, P. V.; KIRICHOK, Y. Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. **Cell**, v. 151, n. 2, p. 400–413, 12 out. 2012.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. The Positive Effects of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) in Obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730–750, 22 jan. 2015.

GOSMANN, G. et al. Phenolic Compounds from Maté (*Ilex paraguariensis*) Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 2, p. 156–161, jun. 2012.

GRAVENA, A. A. F. et al. Excess weight and abdominal obesity in postmenopausal Brazilian women: a population-based study. **BMC women's health**, v. 13, p. 46, 14 nov. 2013.

HARMS, M. J. et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. **Cell metabolism**, v. 19, n. 4, p. 593–604, 1 abr. 2014.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252–1263, out. 2013.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 29, n. 4, p. 577–580, abr. 1981.

KANG, Y.-R. et al. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Laboratory Animal Research**, v. 28, n. 1, p. 23–29, mar. 2012.

KEMMLER, W. et al. Benefits of 2 years of intense exercise on bone density, physical fitness, and blood lipids in early postmenopausal osteopenic women: results of the Erlangen Fitness Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). **Archives of Internal Medicine**, v. 164, n. 10, p. 1084–1091, 24 maio 2004.

KO, S.-H.; JUNG, Y. Energy Metabolism Changes and Dysregulated Lipid Metabolism in Postmenopausal Women. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4556, 20 dez. 2021.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635–643, 6 abr. 2000.

KURYŁOWICZ, A.; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, M. Induction of Adipose Tissue Browning as a Strategy to Combat Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6241, 28 ago. 2020.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 15, n. 9, p. 639–660, set. 2016.

LAFORST, S. et al. Simultaneous quantification of estrogens and glucocorticoids in human adipose tissue by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 195, p. 105476, dez. 2019.

LANDGREN, B.-M. et al. Menopause transition: Annual changes in serum hormonal patterns over the menstrual cycle in women during a nine-year period prior to menopause. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2763–2769, jun. 2004.

LEE, H. et al. Effects of Korean red ginseng (*Panax ginseng*) on obesity and adipose inflammation in ovariectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 229–237, 3 fev. 2016.

LEONARD, S. S. et al. 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. C14-20, fev. 2010.

MADAK-ERDOGAN, Z. et al. Dietary licorice root supplementation reduces diet-induced weight gain, lipid deposition, and hepatic steatosis in ovariectomized mice without stimulating reproductive tissues and mammary gland. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 2, p. 369–380, fev. 2016.

MALTAIS, M. L.; DESROCHES, J.; DIONNE, I. J. Changes in muscle mass and strength after menopause. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 9, n. 4, p. 186–197, dez. 2009.

MARJORIBANKS, J. et al. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, p. CD004143, 17 jan. 2017.

MATSUMOTO, R. L. T. et al. Effects of Mate 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. 5, p. 1775–1780, 11 mar. 2009.

MATTAR, C. N. et al. Menopause, hormone therapy and cardiovascular and cerebrovascular disease. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, v. 37, n. 1, p. 54–62, jan. 2008.

MERLIN, J. et al. Could burning fat start with a brite spark? Pharmacological and nutritional ways to promote thermogenesis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 1, p. 18–42, jan. 2016.

MILNE, J. C. et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. **Nature**, v. 450, n. 7170, p. 712–716, 29 nov. 2007.

MIRANDA, D. D. C. et al. 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, jul. 2008.

MOREIRA-PAIS, A. et al. Sex differences on adipose tissue remodeling: from molecular mechanisms to therapeutic interventions. **Journal of Molecular Medicine**, v. 98, n. 4, p. 483–493, 1 abr. 2020.

MUMUSOGLU, S.; YILDIZ, B. O. Metabolic Syndrome During Menopause. **Current Vascular Pharmacology**, v. 17, n. 6, p. 595–603, 2019.

NACHTIGALL, L. E. The symptoms of perimenopause. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 41, n. 4, p. 921–927, dez. 1998.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 178–185, ago. 2008.

PATEL, S. Disruption of aromatase homeostasis as the cause of a multiplicity of ailments: A comprehensive review. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 168, p. 19–25, abr. 2017.

PFEILSCHIFTER, J. et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 1, p. 90–119, fev. 2002.

PRASUN, P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165838, 1 out. 2020.

PUANGPRAPHANT, S. et al. Dicafeoylquinic 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. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 10, p. 1509–1522, out. 2011.

QIANG, L. et al. Brown Remodeling of White Adipose Tissue by SirT1-Dependent Deacetylation of Ppar $\gamma$ . **Cell**, v. 150, n. 3, p. 620–632, 3 ago. 2012.

RESENDE, P. E. DE et al. The activity of Mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 735–740, 18 dez. 2012.

ROCHA, D. S. et al. Adipose tissue of female Wistar rats respond to *Ilex paraguariensis* treatment after ovariectomy surgery. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 11, n. 3, p. 238–248, maio 2021.

SCHENA, G.; CAPLAN, M. J. Everything You Always Wanted to Know about  $\beta$ 3-AR \* (\* But Were Afraid to Ask). **Cells**, v. 8, n. 4, p. 357, 16 abr. 2019.

SCHERER, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1537–1545, jun. 2006.

SCHILLACI, G. et al. Early cardiac changes after menopause. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 32, n. 4, p. 764–769, out. 1998.

SILVA, R. D. et al. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia**, v. 82, n. 6, p. 818–826, set. 2011.

SIPILÄ, S.; FINNI, T.; KOVANEN, V. Estrogen influences on neuromuscular function in postmenopausal women. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 222–233, mar. 2015.

SMITH, G. I. et al. Testosterone and progesterone, but not estradiol, stimulate muscle protein synthesis in postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 1, p. 256–265, jan. 2014.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094–2101, 1 jun. 2011.

TARDIVO, A. P. et al. Effects of omega-3 on metabolic markers in postmenopausal women with metabolic syndrome. **Climacteric: The Journal of the International Menopause Society**, v. 18, n. 2, p. 290–298, abr. 2015.

VALENÇA, H. DA M. et al. Beneficial effects of *Ilex paraguariensis* in the prevention of obesity-associated metabolic disorders in mice. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 2, p. 1032–1042, fev. 2022.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? **Genes & Development**, v. 27, n. 3, p. 234–250, 1 fev. 2013.

ZIMMERMANN, A.-K. et al. Value of immunohistochemistry in the detection of BRAF(V600E) mutations in fine-needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma. **Cancer Cytopathology**, v. 122, n. 1, p. 48–58, jan. 2014.

ZOIS, C. E. et al. Lipoprotein profile, glycemic control and physical fitness after strength and aerobic training in post-menopausal women with type 2 diabetes. **European Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 6, p. 901–907, ago. 2009.

## Anexos

### Anexo 1: Comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ  
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 13 de junho de 2019

Prezada Professora Luciane Claudia Barcellos,

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: “**Avaliação da Influência do Mate ( *Ilex paraguariensis*) no Metabolismo Energético de Ratas Ovariectomizadas.**”, protocolo n° 109/17, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n°11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n°6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **29/05/2019**.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 13/09/2023
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
N° de animais	70 animais
Peso/idade	200-250g / 2-3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Fernando Pompeu - Av Carlos Chagas Filho 540, Prédio da EEFD, Biotério localizado no Departamento de Biociências da Atividade Física - UFRJ.

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS