

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Instituto de Ciências Básicas Da Saúde

Departamento de Fisiologia Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DO TECIDO ADIPOSEO DE RATAS  
WISTAR APÓS A OVARIECTOMIA E DOS TECIDOS MUSCULAR  
ESQUELÉTICO E HEPÁTICO DE FÊMEAS SUBMETIDAS AO MODELO DE  
DIABETES MELITO TIPO 1 APÓS O TRATAMENTO COM EXTRATO DE  
ERVA-MATE**

Débora Santos Rocha

**Porto Alegre, 28 de agosto de 2020**

**Débora Santos Rocha**

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DO TECIDO ADIPOSO DE RATAS WISTAR APÓS A OVARIECTOMIA E DOS TECIDOS MUSCULAR ESQUELÉTICO E HEPÁTICO DE FÊMEAS SUBMETIDAS AO MODELO DE DIABETES MELITO TIPO 1 APÓS O TRATAMENTO COM EXTRATO DE ERVA-MATE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-

Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

**Orientador: Dr. Luiz Carlos Kucharski**

**Porto Alegre, 2020**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço minha família por todo amor, paciência e apoio em todos os desafios encontrados no decorrer desta trajetória.**

**Ao meu namorado e aos meus amigos pelo amor, amizade e incentivo.**

**Ao meu orientador pelo exemplo, aprendizado, paciência e por confiar no meu trabalho.**

**Aos meus colegas que participaram dos experimentos pela companhia, inspiração e colaboração.**

**Ao CNPq pelo financiamento deste trabalho.**

## RESUMO

*Ilex paraguariensis* tem apresentado potencialidade como candidato a nutracêutico visando seu uso na prevenção/tratamento das mais diversas doenças que envolvam o desequilíbrio energético. Tendo como foco a aplicação em saúde, o interesse científico por esta planta tem crescido, levando à investigação do seu potencial uso como agente antioxidante, anti-inflamatório e antiobesidade. Entretanto, o estudo de desordens metabólicas, bem como dos candidatos terapêuticos, apresenta o dimorfismo sexual como um grande desafio para as pesquisas básica e aplicada. Os estudos da área básica, até a última década, foram conduzidos predominantemente com animais machos. Este delineamento tem gerado um viés importante quando se visa a aplicação em saúde humana, pois o dimorfismo sexual pode ser observado tanto nos fenômenos metabólicos em si, como também no efeito de candidatos terapêuticos sobre eventos de desequilíbrio energético. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as vias metabólicas em fêmeas submetidas à ovariectomia e do modelo de diabetes melito tipo 1 (DM1) e, posteriormente, investigar, de maneira inédita, a eficácia na utilização crônica do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em ambas as condições. Em fêmeas ovariectomizadas, tal investigação teve como foco as vias de síntese e degradação lipídica nos tecidos adiposo marrom, e brancos visceral, retroperitoneal e gonadal. Em fêmeas diabéticas, o ponto central foi o metabolismo de carboidratos dos tecidos muscular esquelético e hepático. Como resultados, foram produzidos dois artigos. No artigo **“Adipose tissue of female Wistar rats respond to *Ilex paraguariensis* treatment after ovariectomy surgery”** foi avaliado o uso potencial do extrato de *Ilex paraguariensis* como agente preventivo e/ou terapêutico do desequilíbrio energético em ratas submetidas ao modelo de ovariectomia. Esta possibilidade foi confirmada, uma vez que o extrato foi capaz de promover melhora no padrão de estoque e mobilização de lipídeos em machos e fêmeas. Particularmente, esse efeito se mostrou sexo-dependente, modulando vias lipogênicas em fêmeas e lipolíticas em machos. O segundo artigo **“*Ilex paraguariensis* modulates liver metabolism in diabetic female Wistar rats”** abordou pela primeira vez o efeito de *Ilex paraguariensis* em fêmeas diabéticas, as quais parecem apresentar fenótipo distinto dos machos submetidos ao mesmo protocolo de DM1. Os dados expostos mostram que *Ilex paraguariensis* foi capaz de modular vias chave do metabolismo hepático, em especial a gliconeogênese e a lipogênese, fato que reafirma a possibilidade do seu uso em doenças metabólicas crônicas. Inúmeros pontos devem ser considerados durante a investigação do extrato de *Ilex paraguariensis* como potencial fitoterápico. Considerando os resultados do estudo com fêmeas diabéticas, foi possível concluir que o modelo de DM1 ainda necessita de investigação. Em especial, os níveis de insulina normais são indicativos da necessidade de uma melhor caracterização do modelo em fêmeas. No entanto, de nosso conhecimento, nossos dados contribuíram com resultados originais em

modelo experimental usando fêmeas diabéticas e deficientes em estrogênio, o que sugere sua aplicabilidade como agente preventivo e / ou terapêutico em vários distúrbios metabólicos de interesse para a saúde. A pesquisa dos efeitos de *Ilex paraguariensis*, bem como de seu efeito dependente de sexo, forneceu uma ampla gama de perguntas a serem respondidas. Como já salientado, os mecanismos responsáveis pela sua ação ainda contemplam um amplo campo de hipóteses. Diante dessas demandas, o presente estudo apresenta como principal perspectiva a elucidação do mecanismo de ação das diferentes frações do extrato.

## ABSTRACT

*Ilex paraguariensis* shows potential for nutraceutical use in prevention / treatment of the most diverse diseases that involve energy imbalance. With a focus on health applications, scientific interest in this plant has growing, leading to the investigation of its potential as an antioxidant, anti-inflammatory and anti-obesity agent. However, the study of metabolic disorders, as well as therapeutic candidates, presents a major challenge for basic and applied research: sexual dimorphism. Studies in basic area, until the last decade, were conducted predominantly with male animals. This design has generated an impressive bias when it is aimed at human health application, since sexual dimorphism can be observed both in the metabolic phenomena themselves, as well as in the effect of therapeutic candidates for energy imbalance events. Thus, the aim of this work was to evaluate the effectiveness in the chronic use of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* in metabolic pathways in females submitted to ovariectomy surgery and the type 1 diabetes mellitus model (DM1). In ovariectomised females, this investigation focused on the synthesis and lipid degradation pathways in brown, and white visceral, retroperitoneal and gonadal adipose tissues. In diabetic females, the central point was the metabolism of carbohydrates on the skeletal muscle and hepatic tissues. As a result, two articles were produced. In the article "Adipose tissue of female Wistar rats respond to *Ilex paraguariensis* treatment after ovariectomy surgery", the potential use of *Ilex paraguariensis* extract as a preventive and / or therapeutic agent of energy imbalance in postmenopausal women was evaluated. This possibility was confirmed since the extract was able to promote improvement in the stock pattern and mobilization of lipids in males and females. This effect proved to be gender-dependent, modulating lipogenic pathways in females and lipolytic pathways in males. The article "*Ilex paraguariensis* modulates liver metabolism in diabetic female Wistar rats" addressed the effect of *Ilex paraguariensis* in diabetic females, which seem to have a distinct phenotype from males submitted to the same DM1 protocol. The exposed data show that *Ilex paraguariensis* was able to modulate key pathways of hepatic metabolism, especially gluconeogenesis and lipogenesis, an outcome that reinforce the possibility of its use in chronic metabolic diseases. Numerous points must be considered during the investigation of *Ilex paraguariensis* extract as a potential herbal medicine. As already noted, the mechanisms responsible for its action still include a wide range of hypotheses. In view of these demands, the present study presents as its main perspective the elucidation of the mechanism of action of the different fractions of the extract. Considering the results of the study with diabetic females, it was possible to conclude that the DM1 model still needs investigation. In particular, normal insulin levels are indicative of the need for better characterization of the model in females. Researching the effects of *Ilex paraguariensis*, as well as its gender-dependent effect, provided a wide range of questions to be answered. However,

to our knowledge, our original data with estrogen-deficient and diabetic females suggests its applicability as a preventive and / or therapeutic agent in several metabolic disorders of interest to health.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representantes das principais frações do extrato de *Ilex paraguariensis* e os efeitos benéficos associados ao consumo de bebidas derivadas de plantas do gênero *Ilex*

Figura 2. Distribuição de estoques de tecido adiposo em homens e mulheres.

Figura 3. Receptores de estradiol ER $\alpha$  e ER $\beta$  no músculo esquelético.

Figura 4. Representação esquemática da importância do estradiol em relação ao metabolismo hepático da glicose e de lipídeos

Figura 5. ER $\alpha$  e ER $\beta$  nas células  $\beta$  do pâncreas



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT : Proteína cinase B

AMPK: Proteína cinase ativada por AMP

DM1: Diabetes melito tipo 1

DM2: Diabetes melito tipo 2

ER $\alpha$ : Receptor de estradiol dos tipos alfa

ER $\beta$ : Receptor de estradiol beta

FSH: Hormônio folículo estimulante

GLP-1: Peptídeo semelhante ao glucagon-1

GLUT-4: Transportador de glicose-4

HDL: Lipoproteína de alta densidade

IRS: Substrato receptor de insulina

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LH: Hormônio luteinizante

NOD: Diabéticos não obesos

OVX: Ovariectomizada

PI3K: Fosfoinositol-3-cinase

SGLT: Transportador sódio-glicose

STZ: Streptozotocina

SUS: Sistema Único de Saúde

TAB: Tecido adiposo branco

TAM : Tecido adiposo marrom

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Ilex paraguariensis</i> e suas frações bioativas de interesse em saúde .....	1
1.2. Peculiaridades metabólicas inerentes ao sexo .....	5
1.2.1. Aspectos distintos do tecido adiposo de fêmeas .....	6
1.2.2. Particularidades do tecido muscular de fêmeas .....	9
1.2.3. Particularidades do tecido hepático de fêmeas .....	13
1.2.4. Diabetes melito tipo 1 e os aspectos discrepantes relativos ao sexo .....	15
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>20</b>
3.1. Objetivo Geral .....	20
3.2. Objetivos Específicos.....	20
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
4.1. Desenho experimental.....	22
4.2. Metodologia do artigo “ <i>Adipose tissue of female Wistar rats respond to Ilex paraguariensis treatment after ovariectomy surgery</i> ” .....	22
4.3. Metodologia do artigo “ <i>Ilex paraguariensis modulates liver metabolism in diabetic female Wistar rats</i> “.....	29
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
5.1. Primeiro Artigo .....	34
5.2. Segundo Artigo .....	68
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>101</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>114</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>115</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Ilex paraguariensis* e suas frações bioativas de interesse em saúde

*Ilex paraguariensis* é uma Aquifoleaceae nativa da América do Sul e normalmente encontrada no Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. As populações destes países têm como hábito a preparação de diferentes extratos aquosos para ingestão popularmente conhecidos como “chimarrão”, “tererê”, “chá mate”. Tendo como foco a aplicação em saúde, o interesse científico por esta planta tem crescido, levando à investigação do seu potencial uso como agente antioxidante, anti-inflamatório, antiobesidade e antimicrobiano (BRACESCO *et al.*, 2003; GONZALEZ *et al.*, 1993; GUGLIUCCI; STAHL, 1995; LUZ *et al.*, 2016). Ainda, o consumo já difundido propiciou maior facilidade na realização de ensaios com humanos, além dos já realizados com modelos animais e cultivos celulares.

Além da presença de diversos minerais, já foram identificados polifenóis, derivados do cafeeol, xantinas e saponinas nesta planta. Um ponto a ser ressaltado é que a variação das concentrações destes fitoquímicos depende das condições de cultivo, processamento manual ou industrial. Estudos demonstram que as condições do solo, tipo de fertilização, idade das folhas, intensidade luminosa e método de secagem alteram a concentração de macro e micronutrientes deste extrato (BASTOS *et al.*, 2007; JACQUES *et al.*, 2007; RESENDE *et al.*, 2000). Além disso, a diversidade genética dos ervais nativos dificulta a investigação dos efeitos biológicos em ensaios controlados, levando a discordâncias na literatura diante da enorme variação de seus compostos bioativos. Entretanto, o mapeamento genômico recente dos diversos tecidos desta planta trouxe novamente a possibilidade de investida mais efetiva, não apenas na otimização da produção industrial, mas também no melhoramento de linhagens com propriedades nutracêuticas, uma vez que permite a seleção de exemplares com concentrações de fitoquímicos adequadas ao uso terapêutico (FAY *et al.*, 2018).

Os polifenóis, são representados por um grupo amplo e heterogêneo de compostos fitoquímicos que contêm anéis fenólicos em sua estrutura química. Estes compostos podem ser encontrados em diversas preparações alimentícias, como chá, café, vinho, vegetais, legumes, frutas, entre outros, e o consumo destes alimentos tem

---

sido associado à diminuição no risco de desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (HANHINEVA *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos têm recebido atenção expressiva da comunidade científica pela sua ação antioxidante e anti-inflamatória (HANHINEVA *et al.*, 2010). Além desses efeitos, a sua ação sobre o metabolismo de carboidratos também tem sido descrita. Os polifenóis ingeridos na dieta são transformados, pela microbiota intestinal, em compostos secundários, os quais podem ser facilmente absorvidos pelo epitélio (SELMA; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2009). Do mesmo modo, a ingestão de compostos fenólicos pode modificar a diversidade da microbiota (SELMA; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2009). Sendo assim, a interação entre os polifenóis da dieta e a microbiota é de notável importância quando avaliados os desfechos fisiológicos destes compostos (SELMA; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2009). Ainda, outros autores têm descrito a alteração na absorção intestinal de carboidratos como consequência da ingestão de polifenóis, o que demonstra a complexidade na interação destas moléculas ainda em um estágio prévio à absorção, levando a desfechos amplos no metabolismo de carboidratos (HANHINEVA *et al.*, 2010).

Ensaio mostram que a fração de polifenóis de *I. paraguariensis* têm apresentado conteúdo de polifenóis e capacidade antioxidante comparável ao extrato de *Camellia sinensis*, popularmente conhecidos como chá verde (CHANDRA; DE MEJIA, 2004). As espécies que compõem o gênero *Ilex* possuem como compostos fenólicos majoritários ácidos cafeoilquínico e seus derivados (GAN *et al.*, 2018). Devido a isso, tais espécies têm sido estudadas quanto às suas ações antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e antiobesidade (GAN *et al.*, 2018). A modulação do metabolismo de carboidratos, principalmente a inibição de sua absorção de carboidratos pelo trato gastrointestinal (além de outras ações, como o impacto sobre a microbiota, absorção de metabólitos fenólicos secundários), parece ser consequência da presença de polifenóis contidos em *Ilex paraguariensis* (GAN *et al.*, 2018). Sendo assim, esta fração de compostos fenólicos apresenta potencialidade no uso contra alterações da homeostase de glicose, bem como na prevenção da ruptura do desequilíbrio do metabolismo de carboidratos em indivíduos saudáveis (GAN *et al.*, 2018).

Já as xantinas têm mostrado ação estimulante e antiobesidade (BOJÍC *et al.*, 2013; GAMBERO; RIBEIRO, 2015; GAO *et al.*, 2013; MURAKAMI *et al.*, 2013; PANG;

---

CHOI; PARK, 2008; STRASSMANN *et al.*, 2008). Metilxantinas são denominadas alcaloides purínicos de caráter anfótero que classicamente apresentam atividade estimulante no sistema nervoso central (DICKEL; RATES; RITTER, 2007). Essas moléculas são representadas principalmente pela cafeína, teobromina e teofilina, sendo que as duas primeiras já foram identificadas em *I. paraguariensis*. (BOJÍĆ *et al.*, 2013; MURAKAMI *et al.*, 2013; STRASSMANN *et al.*, 2008). Inúmeros estudos têm direcionado atenção às propriedades estimulatórias das xantinas. Particularmente, acredita-se que a ação da cafeína envolva a liberação sistêmica de catecolaminas a partir da glândula suprarrenal, como consequência da estimulação do sistema nervoso simpático. Além disso, também ocorra a ação estimulatória direta em tecidos como músculo esquelético através da inibição dos receptores de adenosina (DAVIS *et al.*, 2003; SINCLAIR; GEIGER, 2000; SPRIET, 1995).

Diante disso, diversos autores têm investigado a ação estimulatória do extrato de *I. paraguariensis*, sendo que sua ação antiobesidade poderia ser atribuída também à fração de metilxantinas (DICKEL; RATES; RITTER, 2007; GAMBOA-GÓMEZ *et al.*, 2015). Em cultivo celular, o extrato mostrou-se capaz inibir a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, por meio da redução no acúmulo de triglicérides no citoplasma dos adipócitos e pela diminuição da expressão de genes relacionados à adipogênese em animais submetidos ao modelo de obesidade (ARÇARI *et al.*, 2009; GAMBERO; RIBEIRO, 2015). Em modelo animal, a administração do extrato promoveu menor ganho de peso, melhora do índice de massa corporal, menor ingestão calórica, aumento de indicadores centrais de saciedade (leptina) e diminuição de marcadores pró-inflamatórios (GAO *et al.*, 2013; HUSSEIN *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2014; PANG; CHOI; PARK, 2008; PIMENTEL *et al.*, 2013). Já em humanos saudáveis, após 45 dias de tratamento, houve perda de peso e diminuição do esvaziamento gástrico (ANDERSEN; FOGH, 2001). Assim como já destacado com os polifenóis, os mecanismos envolvidos nestes efeitos podem ser diversos, desde a ação no trato gastrintestinal, indireta por estimulação simpática ou até diretamente nos tecidos alvo em receptores de adenosina (LAFONTAN; LANGIN, 2009; SINCLAIR; GEIGER, 2000).

Outro efeito intimamente relacionado à dislipidemia, o efeito cardioprotetor, já foi descrito em diversos estudos. Em modelos animais de isquemia e reperfusão ou

---

em modelo de infarto em coração isolado, o extrato de erva-mate mostrou efeito protetor semelhante ao exercício e efeito benéfico agudo durante do período de reperfusão, diminuindo as alterações após a isquemia (CAHUÊ *et al.*, 2017; GONZÁLEZ ARBELÁEZ *et al.*, 2016). Em ratos hiperlipidêmicos, o extrato também foi capaz de atenuar o risco de aterosclerose, por ação antioxidante modulação do perfil lipídico (GAO *et al.*, 2013). Estudos com humanos têm sido conduzidos visando a segurança do consumo deste extrato por paciente cardiopatas (CUESTA *et al.*, 2018). Em especial, a população feminina após menopausa, sofre com a queda dos níveis circulantes de estradiol e o aumento do risco de desenvolver patologias cardiovasculares (NICHOLSON *et al.*, 2017). Estas mulheres, após consumo de *Ilex paraguariensis*, apresentaram menos eventos de doença coronária, dislipidemia e hipertensão (DA VEIGA *et al.*, 2018).

De fato, ainda são necessários mais estudos para elucidar as vias antiobesidade sobre as quais *Ilex paraguariensis* atua. Ainda, a avaliação do efeito conjunto do extrato deve ser interpretada com cautela, pois outros compostos bioativos da planta também podem levar a desfechos metabólicos positivos, assim como esses efeitos podem decorrer da ação sinérgica das frações de fenóis, xantinas e saponinas (DE RESENDE *et al.*, 2015). Posto isso, foi avaliado o efeito específico da fração rica em metilxantinas da erva-mate, a qual foi capaz de melhorar o perfil lipídico, reduzir a lipogênese, aumentar a lipólise no tecido adiposo, além de reduzir a adiposidade abdominal em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica (DE RESENDE *et al.*, 2015).

Outro grupo de compostos presentes no extrato de *Ilex paraguariensis* são as saponinas, denominadas matesaponinas (MARTINET *et al.*, 2001; MURAKAMI *et al.*, 2013). Saponinas são compostos anfipáticos ligados a estruturas glicosídicas e com capacidade de interação com diversos compostos hidrofóbicos. Essas moléculas têm revelado de maneira crescente seu potencial anti-inflamatório, hipocolesterolêmico e regulador glicêmico (HECK; DE MEJIA, 2007; LU *et al.*, 2016). Porém, são necessários mais estudos descrevendo a ação biológica das matesaponinas com foco na aplicação em saúde. Em um dos poucos trabalhos com foco na ação das matesaponinas, foi descrito que a fração rica em saponinas derivada da erva-mate possui propriedades importantes no metabolismo de lipídios, capaz de aumentar a

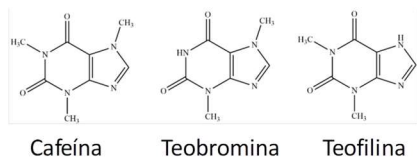
excreção fecal de gordura além de aumentar na lipogênese no tecido adiposo, diminuindo a absorção intestinal deste substrato e, ao mesmo tempo, retirando-o da corrente sanguínea para estoque (DE RESENDE *et al.*, 2015).

Em suma, *I. paraguariensis* apresenta-se como potencial agente antioxidante, anti-inflamatório, antiobesidade. Desse modo, o consumo de extratos do gênero *Ilex*

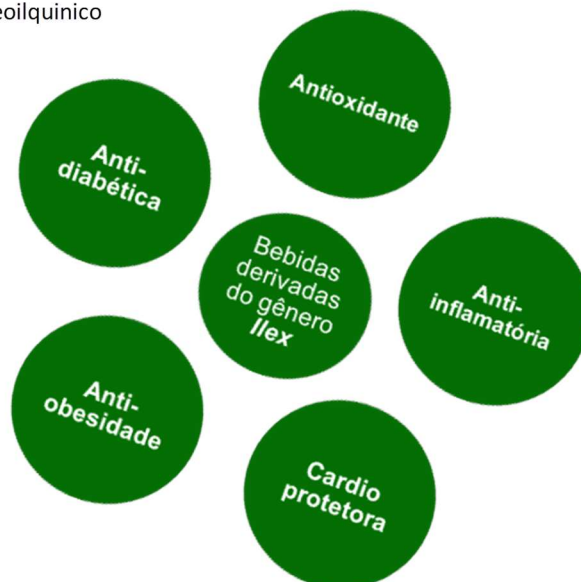
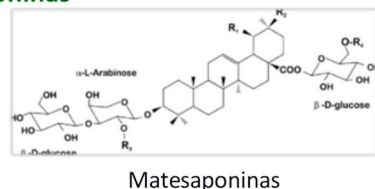
### Polifenóis



### Metilxantinas



### Saponinas



**Figura 3. Representantes das principais frações do extrato de *Ilex paraguariensis* e os efeitos benéficos associados ao consumo de bebidas derivadas de plantas do gênero *Ilex*. Adaptado de Gan *et al.* 2018.**

tem sido associado a diversos efeitos benéficos em saúde (GAN *et al.*, 2018) (**Figura 1**). Sendo assim, a potencialidade deste extrato como bom candidato a nutracêutico deve ser investigada visando seu uso na prevenção/tratamento das mais diversas doenças que envolvam o desequilíbrio energético.

## 1.2. Peculiaridades metabólicas inerentes ao sexo

O dimorfismo sexual do metabolismo apresenta-se como um grande desafio para as pesquisas básica e aplicada, isso porque os estudos da área básica, até a última década, foram conduzidos predominantemente com animais machos

---

(ZUCKER; BEERY, 2010). Este delineamento tem gerado um viés importante quando se visa a aplicação em saúde humana, pois o dimorfismo sexual pode ser observado tanto nos fenômenos metabólicos em si, como também no efeito de candidatos terapêuticos sobre eventos de desequilíbrio energético (VALENCAK; OSTERRIEDER; SCHULZ, 2017).

Em se tratando da investigação dos fenômenos metabólicos dependentes do sexo *per se*, a literatura já se apresenta bastante robusta (BELL *et al.*, 1994; MAUVAIS-JARVIS, 2017; NEWELL-FUGATE, 2017). Evolutivamente, machos e fêmeas desenvolveram adaptações relativas às suas necessidades. Basicamente, as fêmeas mobilizam suas reservas energéticas gradualmente, priorizando as necessidades metabólicas da prole durante a gestação e lactação. Este fato já não é observado em machos, os quais utilizam rapidamente seus estoques energéticos conforme a demanda (VAGUE, 1947). Quando avaliados particularmente os diferentes depósitos de tecido adiposo branco, é possível constatar a dinâmica das reservas de triglicerídeos quanto à distribuição e ao padrão estoque/mobilização em machos e fêmeas.

### **1.2.1. Aspectos distintos do tecido adiposo de fêmeas**

Um aspecto particular das fêmeas em idade reprodutiva é a variação no padrão estoque/degradação de lipídios de acordo com a fase do ciclo estral (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). No proestro, período periovulatório, a lipogênese do tecido adiposo branco (TAB) se encontra aumentada. Já no estro e diestro, fases lútea e folicular, respectivamente, o fenômeno predominante é a lipólise (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). A interpretação deste evento pode ser entendida pela variação dos hormônios sexuais. No proestro, ocorre o aumento dos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), progesterona e estradiol. Em seguida, na ausência de implantação do embrião, ocorre o estro, quando FSH, LH e estradiol têm seus níveis diminuídos, e a progesterona apresenta uma concentração ainda expressiva, porém em diminuição gradual (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). Já no diestro 1 os níveis de progesterona finalmente diminuem e os hormônios FSH, LH e estradiol se mantêm em valores baixos. Por fim, no diestro 2, os níveis de estradiol se encontram em aumento gradual (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). Deste modo, a importância destes hormônios na síntese/mobilização de lipídeos no tecido adiposo foi



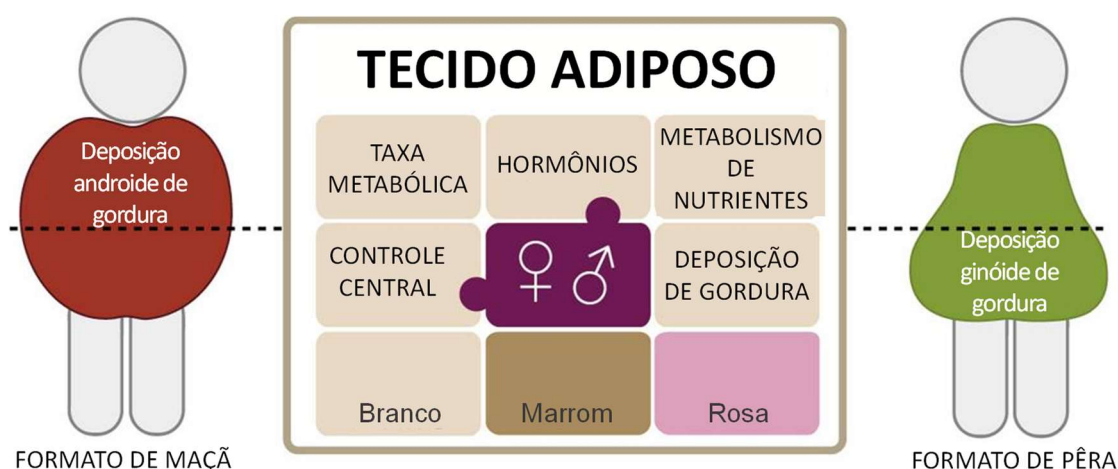
---

investigada. De fato, em ratas ovariectomizadas, essa variação no metabolismo do TAB é interrompida. Ainda, quando efetuado o tratamento com progesterona nestes mesmos animais, ocorre o aumento de depósito de lipídeos, fenômeno que não ocorre no tratamento com estradiol (HANSEN; FAHMY; NIELSEN, 2008).

Em se tratando da distribuição de estoques de tecido adiposo em machos e fêmeas, é possível observar os padrões de depósito ginoide e androide, também influenciados pelos níveis circulantes de esteroides sexuais (**Figura 2**). Geralmente, mulheres apresentam adiposidade total aumentada em comparação a homens (GALLAGHER *et al.*, 1996); entretanto, homens apresentam maior tecido adiposo visceral, localizado na região abdominal, levando ao fenótipo “central” de depósito, o qual tem sido relacionado ao aumento no risco de desordens metabólicas (KARASTERGIOU *et al.*, 2012). Por outro lado, mulheres apresentam menos TAB visceral e mais TAB subcutâneo, levando ao fenótipo “gluteofemoral” de depósito, o qual traduz um padrão de menor risco para desordens metabólicas (KARASTERGIOU *et al.*, 2012). Cabe ressaltar que esses padrões não uma norma, havendo a possibilidade de ocorrência de mulheres com fenótipo “central” e homens

com fenótipo “gluteofemoral”. Entretanto, o risco de obesidade central deve ser sempre um fator de alerta, independente do sexo (WHITE; TCHOUKALOVA, 2014).

Em concordância com padrão cíclico observado nas fêmeas, os esteroides sexuais circulantes também alteram o fenótipo de estoque de tecido adiposo (NEWELL-FUGATE, 2017). Tanto a menopausa quanto a castração de fêmeas em idade reprodutiva, caracterizados pela ausência de efeito dos estrogênios, levam ao



**Figura 2.** Distribuição de estoques de tecido adiposo em homens e mulheres. Os padrões de depósito ginoide e androide são influenciados pelos níveis circulantes de esteroides sexuais. Adaptado de (Valencak, Osterrieder e Schulz, 2017).

aumento de TAB, particularmente, oriundo do acúmulo “central” de gordura (NEWELL-FUGATE, 2017). Além disso, mulheres pós-menopausa tratadas com terapia de reposição hormonal têm padrão de depósito revertido ao fenótipo ginoide (RYAN; NICKLAS; BERMAN, 2002). Doenças relacionadas ao aumento da concentração de hormônios androgênicos em mulheres, como a síndrome do ovário policístico ou hiperplasia adrenal congênita, levam à mudança de padrão “gluteofemoral” para “central” em fêmeas (SIRMANS; PATE, 2013). Ou seja, tanto o aumento nos androgênios circulantes quanto a ausência dos estrogênios são suficientes na indução ao padrão insulinoresistente de estoque de tecido adiposo em fêmeas (NEWELL-FUGATE, 2017; SIRMANS; PATE, 2013). Cabe salientar que o papel dos androgênios em machos não necessariamente é prejudicial em relação a sensibilidade à insulina. Estudos envolvendo machos tratados com testosterona têm apresentado discordâncias, sendo que alguns descrevem a diminuição de lipólise e aumento de

---

síntese no TAB visceral (LIVINGSTONE; COLLISON, 2002). Outros citam ainda o aumento de translocação de GLUT-4 para a membrana dos adipócitos após tratamento com androgênios, fenótipo representativo de menor risco de desenvolvimento de alterações energéticas (NEWELL-FUGATE, 2017). Ainda alguns estudos demonstram que a terapia com testosterona foi capaz de diminuir a resistência à insulina no fígado e aumentar a expressão de GLUT-4 no músculo esquelético (BIANCHI; LOCATELLI, 2018). Isso seria, segundo os autores, devido ao aumento local do estradiol no TAB destes machos, indicando que o estradiol local no tecido adiposo interfere na resposta sistêmica à insulina (BIANCHI; LOCATELLI, 2018). Nesse contexto, tal estrogênio poderia ser oriundo da corrente sanguínea e conversão local (fêmeas) ou da conversão local de testosterona em estradiol (machos) (BIANCHI; LOCATELLI, 2018). Adicionalmente, um estudo com voluntários mostrou que o tratamento com inibidor de aromatase leva à sensibilidade diminuída à insulina (GIBB *et al.*, 2016).

Como já ressaltado, o estoque de tecido adiposo subcutâneo tem menor capacidade de mobilização e serve como principal ponto de acúmulo em mulheres (KARASTERGIOU *et al.*, 2012). Já o depósito adiposo visceral, o qual tem capacidade de ser mobilizado rapidamente, desempenha papel mais significativo em homens (KARASTERGIOU *et al.*, 2012). A maior responsividade do tecido adiposo branco visceral aos hormônios de ação catabólica, entre outros fatores, tem sido explicada pela maior presença de receptores adrenérgicos do tipo  $\beta$  em detrimento do  $\alpha$ . Desse modo, a modulação destes receptores tem ganhado atenção significativa de grupos de pesquisa que analisam o padrão de estoque e mobilização de diferentes depósitos de tecido adiposo (ENZI *et al.*, 1986; LANGIN, 2006)

Em relação ao tecido adiposo marrom (TAM), também é descrito dimorfismo sexual neste depósito em particular (CYPESS *et al.*, 2009; VALENCAK; OSTERRIEDER; SCHULZ, 2017). O TAM possui metabolismo peculiar relacionado ao fenômeno de termogênese sem tremor (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017), com maior lipogênese a partir de glicose junto à alta atividade lipolítica, produzindo substrato para a própria oxidação de ácidos graxos (VAN DAM *et al.*, 2017). Também esse tecido tem a função de tamponamento, utilizando, além da própria produção, os ácidos graxos circulantes para  $\beta$ -oxidação, diminuindo os níveis circulantes de lipídeos (HOEKE *et al.*, 2016).

---

Autores descrevem que mulheres/ fêmeas apresentam maiores massa, atividade energética, conteúdo de mitocôndrias e número de cristas por mitocôndria em TAM quando comparadas aos homens/ machos (CYPESS *et al.*, 2009; VALENCAK; OSTERRIEDER; SCHULZ, 2017). Além disso, o TAB das mulheres parecem ser mais responsivas ao fenômeno conhecido como “*browning*” via estimulação adrenérgica, que resulta em uma mudança de fenótipo do TAB para TAM, compreendendo os aumentos de densidade mitocondrial, número de gotículas lipídicas no citoplasma,  $\beta$ -oxidação e atividade energética (KIEFER, 2016; VAN DAM *et al.*, 2017).

### **1.2.2. Particularidades do tecido muscular de fêmeas**

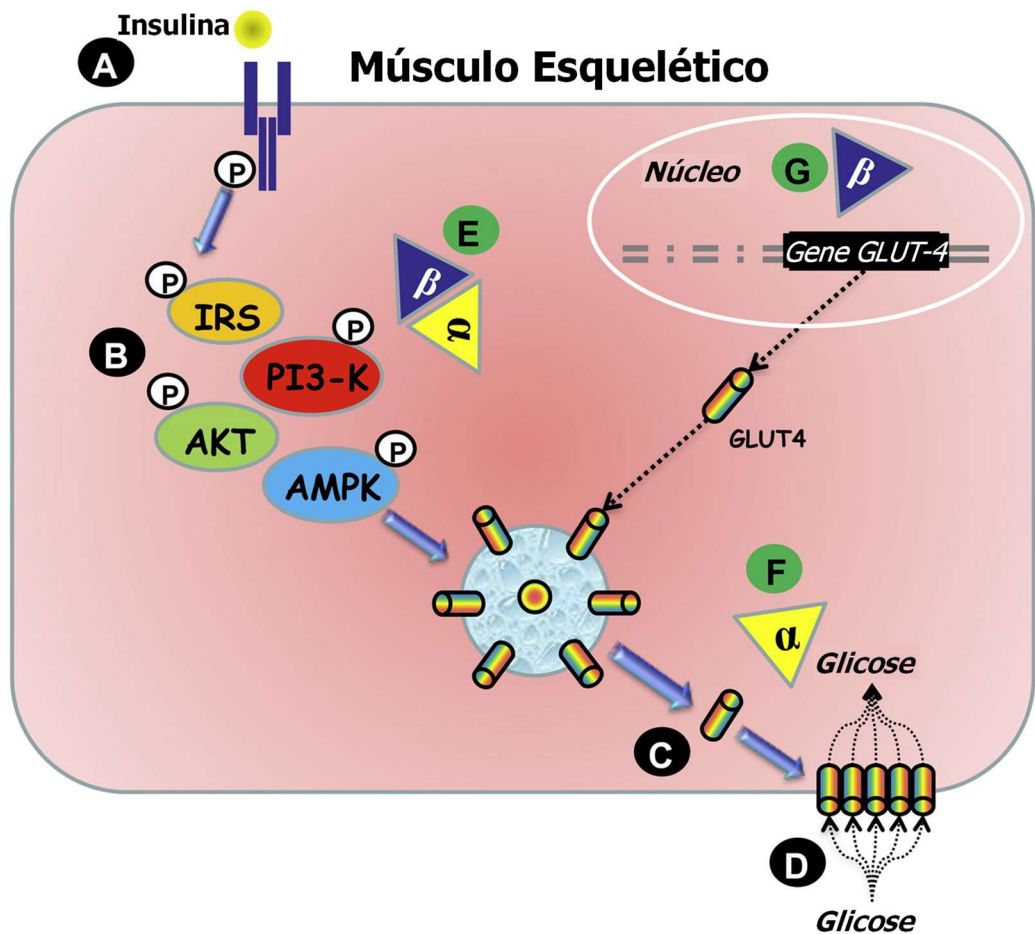
Além das diferenças inerentes ao sexo quanto à adiposidade, outros tecidos têm características sabidamente distintas entre machos e fêmeas, e em se tratando dos tecidos muscular e hepático, não é diferente (GALLAGHER *et al.*, 1997; WILLIAMS, 2004).

O músculo esquelético tem papel crucial na homeostase da glicose, sendo responsável pela maior parte da captação basal e insulino-estimulada de glicose (DEFRONZO; TRIPATHY, 2009). Após a ligação com seus receptores, a insulina ativa uma cascata de fosforilação, que envolve inúmeras proteínas: substrato receptor de insulina (IRS), fosfoinositol-3-cinase (PI3K), proteína cinase B (Akt), proteína cinase ativada por AMP (AMPK), levando finalmente à translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática, permitindo o transporte de glicose para o interior da célula (BJÖRNHOLM; ZIERATH, 2005).

Além disso, a sarcopenia associada à idade avançada, representada pelo declínio da massa muscular, contribui, entre outros fatores, para o aumento do risco de desenvolvimento de diabetes melito tipo 2 (DM2) (LARSEN *et al.*, 2016). Os contrastes sexo-dependentes relativos ao tecido muscular surgem durante a puberdade, quanto meninos têm ganho de massa muscular superior quando comparados a meninas (KANEHISA *et al.*, 1994). Já na vida adulta, homens permanecem com maior massa muscular; entretanto, durante o envelhecimento, perda muscular também é maior em relação às mulheres (GALLAGHER *et al.*, 1997).

---

Em se tratando do papel dos estrogênios neste tecido, inúmeros autores têm explorado a importância do estradiol e da progesterona quanto à homeostase da glicose (BARROS; GUSTAFSSON, 2011). Durante o período de pós-menopausa, o tratamento com reposição hormonal mostrou-se eficaz na reversão da sarcopenia, sugerindo que os estrogênios têm papel importante na fisiologia muscular, porém os mecanismos ainda são pouco conhecidos (GREISING *et al.*, 2009; PHILLIPS *et al.*, 1993). Um mecanismo proposto seria o papel benéfico do estradiol quanto à sensibilidade à insulina (LIVINGSTONE; COLLISON, 2002). A expressão de GLUT-4 sofre influência das fases do ciclo estral de ratas, sendo naturalmente mais alta no proestro. Além disso, fêmeas ovariectomizadas tratadas com estradiol têm aumento de GLUT-4 (DE LOS ANGELES CARRASCO-RUIZ *et al.*, 2018). Especificamente os receptores de estradiol dos tipos alfa e beta (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), têm apresentado papéis distintos no tecido muscular esquelético. Pelo uso do bloqueio seletivo dos receptores de estradiol em camundongos, autores descrevem que ER $\alpha$  apresenta um papel benéfico, e sua estimulação promove aumento na expressão de GLUT-4. Por outro lado, ER $\beta$  apresenta papel oposto, diminuindo a expressão de GLUT-4 (BARROS; GUSTAFSSON, 2011). **(Figura 3)**



**Figura 3.** Receptores de estradiol ER $\alpha$  e ER $\beta$  no músculo esquelético. Etapas A-D descrevem desde o efeito da ligação da insulina em seu receptor (IR) até a translocação de GLUT-4 na membrana plasmática. Os ERs modulam diferentes etapas desta via de sinalização, sendo que ER $\alpha$  modula a translocação de GLUT-4 para a membrana e ER $\beta$  é um repressor da transcrição de GLUT-4. Substrato receptor de insulina (IRS), fosfoinositol-3-cinase (PI3K), proteína cinase B (Akt), proteína cinase ativada por AMP (AMPK), transportador de glicose 4 (GLUT-4). Adaptado de (BARROS; GUSTAFSSON, 2011).

Adicionalmente, trabalhos que mimetizam a redução de estrogênios em fêmeas, por meio da cirurgia de ovariectomia, têm exibido diversos desfechos associados à reposição de estradiol e progesterona. No tecido muscular, a administração de estradiol mostrou aumentar o conteúdo de glicogênio independente da presença da progesterona (BAILEY; AHMED-SOROUR, 1980). Já outros autores descrevem que a progesterona seria capaz de diminuir a resposta ao estradiol, mesmo não sendo capaz de atuar sozinha (PUAH; BAILEY, 1985). De fato, o estradiol tem se mostrado o principal causador dos desfechos apresentados, levando a melhora

---

da resposta à insulina, através do aumento de AMPK fosforilada, Akt e da captação de glicose (BUNIAM *et al.*, 2019; KAWAKAMI *et al.*, 2018).

### **1.2.3. Particularidades do tecido hepático de fêmeas**

O tecido hepático é um componente-chave da homeostase da glicose e lipídios. No período pós-prandial, a insulina reduz a produção hepática de glicose e estimula as vias de síntese. Por outro lado, o hormônio contrarregulador glucagon estimula a glicogenólise e gliconeogênese, vias que promovem a degradação e liberação de glicose para a corrente sanguínea (MITRAKOU *et al.*, 1992; SCHNEDL *et al.*, 1994; STUNKARD, 1996). Além disso, a insulina diminui a concentração de ácidos graxos livres, suprimindo a lipólise no tecido adiposo. Essa diminuição na lipólise interfere na produção hepática de glicose pela gliconeogênese uma vez que o glicerol também é uma fonte de carbono, convertido, de maneira sequencial, em glicerol-3-fosfato, di-hidroxiacetona-fosfato, gliceraldeído-6-fosfato ou frutose-1,6-bifosfato nas etapas finais da via gliconeogênica (CHEN; IQBAL; BODEN, 1999).

Assim como no tecido adiposo e músculo esquelético, é possível observar no fígado alguns contrastes relacionados ao sexo (KOLOVOU *et al.*, 2009; WILLIAMS, 2004). Um deles é a própria prevalência de desequilíbrios da homeostase hepática de glicose e lipídeos, os quais são mais prevalentes em indivíduos do sexo masculino. Estes distúrbios de função hepática são relacionados à dislipidemia, resistência à insulina e hiperglicemia, sendo que a hipercolesterolemia e a esteatose são mais observadas em homens (KOLOVOU *et al.*, 2009). Ainda essas alterações são acompanhadas por um pior no perfil lipídico (KOLOVOU *et al.*, 2009). Mulheres normalmente apresentam um perfil lipídico mais favorável, como menores concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL), maiores de lipoproteína de alta densidade (HDL) e menores níveis de triglicerídeos quando comparadas aos homens (WILLIAMS, 2004).

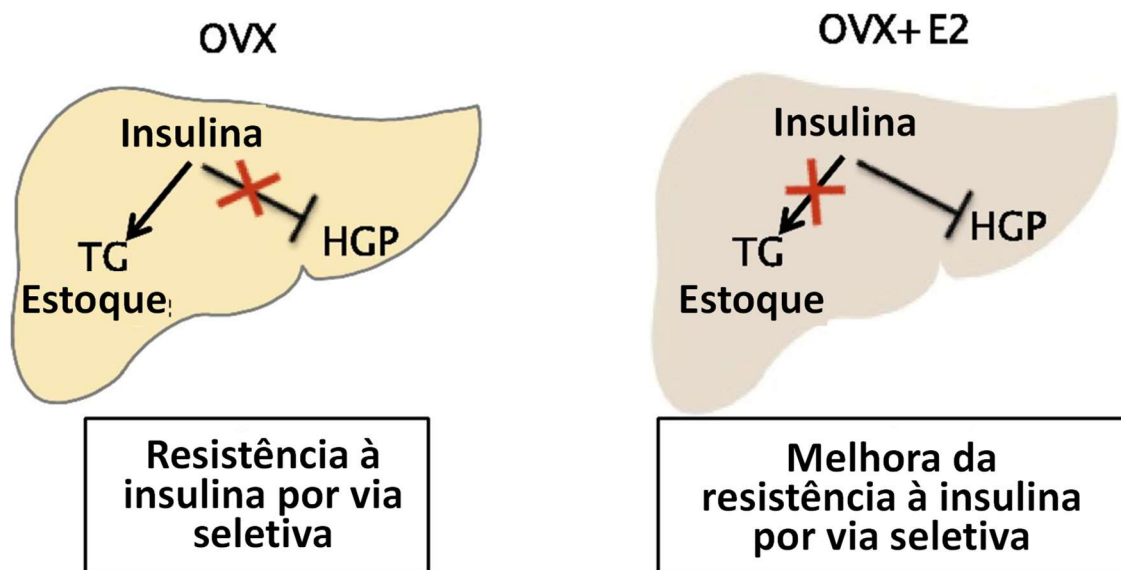
Diante disso, diversos autores têm investigado a origem deste dimorfismo (PALMISANO; ZHU; STAFFORD, 2017; REDIG; MUNSHI, 2010; VILLA *et al.*, 2012). Verificando a expressão gênica no fígado de humanos saudáveis, uma ampla gama de genes parece sofrer interferência dependente do sexo, e desempenham papel importante na organização da cromatina, reprodução e metabolismo lipídico.

---

Especificamente nos genes envolvidos no metabolismo lipídico, estão envolvidos 30 *loci* associados previamente aos níveis circulantes de LDL, HDL e triglicérides. (PALMISANO; ZHU; STAFFORD, 2017). Em camundongos, o ciclo estral acompanha a atividade do receptor ER $\alpha$ , gerando pulsos na expressão de genes relacionados a síntese de colesterol e ácidos graxos (VILLA *et al.*, 2012). Por fim, um estudo com mulheres em terapia antiestrogênica contra câncer de mama mostrou que estes fármacos afetam o perfil lipídico e aumentam o risco de esteatose (REDIG; MUNSHI, 2010). Ainda se salienta que, diante da necessidade desta terapia, deve ser feito o acompanhamento importante da função hepática diante do aumentado risco de desenvolvimento de síndrome metabólica na diminuição da ação benéfica dos estrogênios sobre o metabolismo hepático (REDIG; MUNSHI, 2010).

Em fêmeas ovariectomizadas, o tratamento com estradiol diminui o indicadores de esteatose e a concentração tecidual de triglicérides (BUNIAM *et al.*, 2019). Também, o tratamento com estradiol em ovariectomizadas diminui gliconeogênese hepática, tendo a progesterona efeito oposto (BAILEY; AHMED-SOROOR, 1980). Em sendo o receptor ER $\alpha$ , em detrimento do ER $\beta$ , predominante no fígado, atribui-se a à isoforma alfa os desfechos benéficos da terapia com estradiol (GAO *et al.*, 2008). Ademais, a estimulação do receptor ER $\alpha$  tem sido relacionada ao controle da inflamação local, melhora na homeostase de glicose, lipídeos e proteínas, enquanto a estimulação do ER $\beta$  hepático tem sido associada a atenuação da via de sinalização de insulina via Akt (BARROS; GUSTAFSSON, 2011). Desse modo, a ação benéfica do estradiol no tecido hepático parece interferir positivamente no balanço de carboidratos e lipídeos (**Figura 4**)





**Figura 4.** Representação esquemática da importância do estradiol em relação ao metabolismo hepático da glicose e de lipídeos. Após consumo de dieta hiperlipídica e ovariectomia (OVX), a insulina não é capaz de suprimir a produção de glicose hepática (HGP), além de promover o estoque de triglicerídeos (TG). O tratamento com estradiol (E2) melhora a função da insulina em suprimir a HGP e em bloquear o estoque de TG. Adaptado de (ZHU *et al.*, 2013)

#### 1.2.4. Diabetes melito tipo 1 e os aspectos discrepantes relativos ao sexo

É bem descrita a associação do diabetes melito tipo 1 (DM1), que promove o desequilíbrio energético (ALBERTI; ZIMMET, 1998; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). O DM1 compreende uma série de desordens metabólicas decorrentes da falha na ação da insulina. A insuficiência deste hormônio promove desequilíbrio energético celular, diminuindo a estimulação de vias de estoque energético e levando ao aumento relativo das vias de degradação, culminando no comprometimento das funções fisiológicas do organismo (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). Mesmo diante dos avanços no tratamento dos pacientes com DM1, como as bombas de insulina, monitores portáteis de glicose e indicação de hábitos de vida saudáveis, ainda não há cura conhecida para essa doença (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; RENARD, 2018). Ainda, as terapias adjuvantes com metformina, agonistas GLP-1, e inibidores de SGLT 1 e 2, têm promovido um melhor

---

controle do desenvolvimento de patologias associadas, mas trazem consigo diversos efeitos colaterais (NALLY *et al.*, 2019).

Outro ponto intrigante é a recente reanálise da história natural do DM1. Classicamente conhecida como diabetes juvenil e autoimune, autores têm descrito fatores de confusão para o exato diagnóstico, tais como o desenvolvimento de DM1 em idade adulta, a presença concomitante de DM1 e obesidade, além de indivíduos com DM2 que apresentam anticorpos anti-ilhotas pancreáticas (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; EISENBARTH, 2007).

O DM1 apresenta-se como umas das doenças autoimunes mais comuns no mundo, sendo sua prevalência de 0.3 a 0.5% (BRIET *et al.*, 2018). Autores ainda sugerem que a estimativa é que de a incidência global duplique até a próxima década, o que não poderia ser explicado apenas pelo fator genético. Assim, o fator genético parece não ser significativamente determinante como se tem afirmado nas últimas décadas, o que conduz para uma nova perspectiva de investigação, a fim de determinar a importância de fatores ambientais no desenvolvimento de DM1. (PATTERSON *et al.*, 2009; PODAR *et al.*, 2000; SOLTESZ; PATTERSON; DAHLQUIST, 2007).

A incidência e a mortalidade por DM1 aumentaram, em especial na América Central e países Europeus (PATTERSON *et al.*, 2012). Na Europa, o crescimento anual em crianças variou de 0,6% a 15% nos 36 centros da EURODIAB entre 1989 e 2003 (PATTERSON *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, por sua vez, houve um aumento anual em brancos não-hispânicos com menos de 14 anos de 27,5 indivíduos em média por 100000 habitantes por ano (BELL *et al.*, 2009). No Brasil, esta doença tem grande impacto no Sistema Único de Saúde (SUS). O custo médico médio anual per capita foi de 2638,3 reais (R\$). Os gastos relacionados ao tratamento – 2432,66 R\$ por paciente por ano - representaram 92,20% do total de custos médicos diretos. Suprimentos para administração de insulina e para automonitoramento da glicemia (1393,56 R\$ por paciente por ano) representaram 52,82% desses custos totais. Juntos, os procedimentos médicos e a hemodiálise representaram 5,73% (151,28 R\$ por paciente por ano) de custos médicos diretos. As consultas foram responsáveis por 1,94% dos custos médicos diretos (51,24 R\$ por paciente por ano) (COBAS *et al.*, 2013). Também, um estudo realizado com 1774 pacientes adultos, de diferentes regiões do Brasil, com DM1 há 14,3 anos em média, entre 2008 e 2010, mostrou que menos de 30% dos pacientes têm conseguido controlar a dislipidemia e hipertensão associadas à doença. Ainda, a identificação de retinopatia

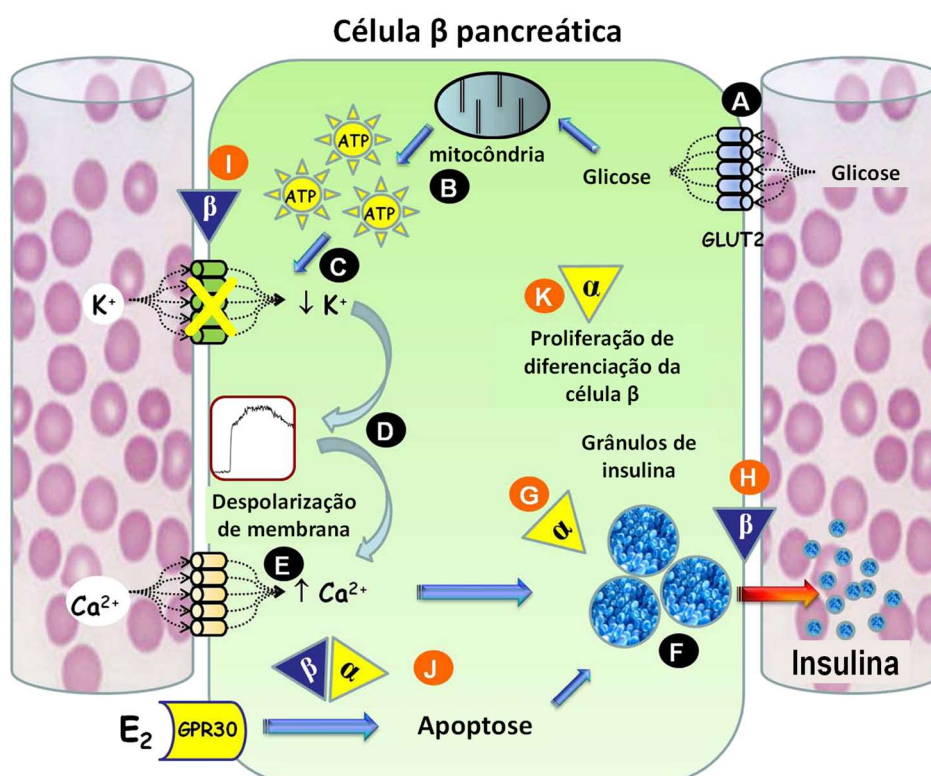
---

ocorreu em 70,1% dos casos com mais de 5 anos, a nefropatia em 63,1% e complicações do pé diabético em 65,1% (GOMES *et al.*, 2012). Assim, mesmo diante dos gastos destinados, o controle do DM1 no Brasil ainda não é uma realidade para a população.

Outro ponto historicamente negligenciado, em especial pelos estudos como modelo animal de diabetes, é o dimorfismo sexual do metabolismo. Tal resgate apresenta um grande desafio para os estudos em animais conduzidos até então predominantemente em machos. A necessidade desta investigação se torna mais clara, uma vez que inúmeros grupos têm observado diferentes desfechos tanto no desenvolvimento de patologias como no tratamento de indivíduos do sexo feminino em relação ao masculino (SANDIKCI; KARAGENC; YILDIZ, 2017a; VITAL; LARRIETA; HIRIART, 2006). No DM1 não é diferente, o papel do estradiol na sinalização do pâncreas, como agente protetor não pode ser negligenciado. Em animais controle, as características do pâncreas endócrino variam de acordo com o sexo (VITAL; LARRIETA; HIRIART, 2006). Fêmeas apresentam área 40% maior correspondente as ilhotas, número 22% maior de células  $\beta$  e 50% maior de células  $\alpha$ ; entretanto, a diminuição da glicose circulante em resposta à injeção de insulina é menor em fêmeas (VITAL; LARRIETA; HIRIART, 2006). A presença de diferentes tipos de receptor de estradiol no pâncreas também indica que este hormônio tem um papel importante em fêmeas, levando a uma resposta diferenciada do pâncreas em condições fisiológicas e patológicas (SANDIKCI; KARAGENC; YILDIZ, 2017b; VITAL; LARRIETA; HIRIART, 2006).

Avaliando-se as flutuações hormonais intrínsecas do ciclo estral em relação à insulina, é possível observar uma interação complexa entre o pâncreas, hipófise e ovários (MORIMOTO *et al.*, 2001). Durante o proestro, o pâncreas de ratas apresenta expressão maior de insulina, e menor no diestro (MORIMOTO *et al.*, 2001). Mais, a insulina é capaz de interferir na secreção de FSH e LH, e provavelmente na secreção de estradiol pelos folículos ovarianos. Este mesmo trabalho justifica esta responsividade à presença dos transportadores de glicose 1 (GLUT-1) e GLUT-4 e do receptor de insulina na membrana dos folículos. Ademais, o LH é capaz de alterar a função de hexocinase concomitantemente à captação de glicose pelos folículos (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016). Em ratas submetidas ao modelo de STZ, por outro lado, o aumento de glicose foi capaz de alterar a concentração de estradiol e progesterona (CHABROLLE *et al.*, 2008).

O papel dos receptores ER $\alpha$  e ER  $\beta$  no pâncreas tem se mostrado importante em condições fisiológicas e patológicas, em especial, acerca das funções de proliferação, diferenciação e sobrevivência das células  $\beta$  pancreáticas (BARROS; GUSTAFSSON, 2011). A regulação da síntese e liberação de insulina parece envolver vias genômica e não genômica, porém mais estudos são necessários com a finalidade de elucidar tais pontos e propor terapias mais direcionadas à gênese do estresse da célula  $\beta$  (BARROS; GUSTAFSSON, 2011) (**Figura 5**).



**Figura 5.** ER $\alpha$  e ER $\beta$  nas células  $\beta$  do pâncreas. Etapas A-F descrevem o efeito do influxo de glicose, via GLUT-2, sobre a secreção de insulina pelas células  $\beta$ . A estimulação de ER  $\alpha$  leva ao aumento de síntese de insulina e o ER  $\beta$  é importante na liberação das vesículas de insulina. Ambos têm efeitos sobre a proteção induzida por estradiol (E<sub>2</sub>) na apoptose. Ainda ER  $\alpha$  regula os processos de proliferação e diferenciação celular. Adaptado de (BARROS; GUSTAFSSON, 2011).

Quanto ao DM1 experimental, machos têm demonstrado serem mais sensíveis ao protocolo clássico por injeção de streptozotocina (STZ), uma droga nociva às células  $\beta$  pancreáticas, desenvolvendo mais facilmente a doença e apresentando um grau mais

---

severo de danos e complicações associados à doença (BELL *et al.*, 1994; DEEDS *et al.*, 2011; GOYAL *et al.*, 2016). Ainda, a insulina residual após a indução por STZ tem apresentado diferenças também, sendo maior nas fêmeas, as quais também exibem hiperglicemia mais branda (CHAUDHARI; KIM; YUN, 2015; THAEOMOR *et al.*, 2017). Tanto nos protocolos com STZ, aloxano e camundongos NOD, alguns autores confirmam a hiperglicemia e hipoinsulinemia de seus experimentos com animais fêmeas, assegurando uma avaliação mais fidedigna dos dados em relação do DM1 (GOYAL *et al.*, 2016). Entretanto, diversos autores têm encontrado dados contraditórios nestes mesmos modelos em fêmeas, em que a hiperglicemia não necessariamente é acompanhada pela diminuição dos níveis de insulina, nem pela insulinite. Valitsky *et al.* (2017), utilizando camundongos NOD, observou hiperglicemia, mas índice de insulinite igual ao dos animais controle (VALITSKY *et al.*, 2017b).

Ainda em se tratando dos modelos de indução do DM1, o estradiol atua como protetor durante o insulto ao pâncreas promovido por STZ. Camundongos deficientes em estradiol apresentam prevenção ao dano pancreático quando tratados com estradiol (LE MAY *et al.*, 2006). Sandikci, Karagenc e Yildiz (2017) observaram que fêmeas adultas aumentam a expressão do receptor alfa de estradiol no pâncreas logo após o insulto com STZ (SANDIKCI; KARAGENC; YILDIZ, 2017a). Além disso, fêmeas ovariectomizadas (OVX) apresentam um perfil mais parecido com machos em relação a sensibilidade ao método de indução do DM1 por injeção de STZ. Aparentemente, a diminuição na concentração de estradiol circulante, por si só, diminui a efetividade na resposta de proteção do pâncreas a diferentes insultos (SANDIKCI; KARAGENC; YILDIZ, 2017a).

Quanto aos estudos conduzidos com indivíduos com DM1, alguns ressaltam o viés de sexo, que pode culminar na generalização errônea dos resultados (BLOHME *et al.*, 1992; PICOZZI; DELUCA, 2019). Por exemplo, um estudo caso-controle retrospectivo, com indivíduos de 12 a 19 anos de idade, mostrou que o desenvolvimento de depressão está associado ao mau controle glicêmico apenas em meninas com DM1 (PICOZZI; DELUCA, 2019). Em outro estudo com adolescentes com DM1, foram observados níveis menores de estradiol em indivíduos com DM1 em desenvolvimento, além da puberdade precoce estar associada ao menor risco de desenvolvimento desta doença (BLOHME *et al.*, 1992).

Sendo assim, a abordagem sexo-dependente se faz necessária em diversos níveis de investigação desta doença. Seu curso natural, o desenvolvimento de patologias associadas, bem como a análise de potenciais agentes de prevenção/ tratamento precisam

---

englobar as fêmeas. Tal abordagem pode revelar mecanismos distintos no desenvolvimento de patologias clássicas, bem como resposta diferente a candidatos terapêuticos.

## 2. HIPÓTESE

**Artigo 1:** O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* possui efeitos dependentes do sexo. Em fêmeas submetidas à cirurgia de ovariectomia, o extrato atua como modulador de vias-chave no metabolismo lipídico em diferentes depósitos de tecido adiposo.

**Artigo 2:** Fêmeas diabéticas apresentam fenótipo distinto de diabetes melito tipo 1. *I. paraguariensis* é capaz de reverter parcial ou totalmente o estado catabólico dos tecidos muscular esquelético e hepático.

Em ambos, o extrato promove a melhora do perfil lipídico e diminuição da glicemia concomitantemente aos demais desfechos.

## 3. OBJETIVO

### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a vias metabólicas em fêmeas submetidas à ovariectomia e ao modelo de DM1 e, posteriormente, investigar a eficácia na utilização crônica do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em ambas as condições.

**Artigo 1:** Em fêmeas ovariectomizadas, tal investigação tem como foco as vias de síntese e degradação lipídica nos tecidos adiposo marrom, e brancos visceral, retroperitoneal e gonadal.

**Artigo 2:** Em fêmeas diabéticas, o ponto central é o metabolismo de carboidratos dos tecidos muscular esquelético e hepático.

### 3.2. Objetivos específicos

#### 3.2.1. Artigo1

3.2.1.1. Realizar a cirurgia de ovariectomia e acompanhar se o tratamento de 45 dias com o extrato é capaz de modificar o ganho de peso total em comparação aos machos controle.

3.2.1.2. Determinar a fase do ciclo estral previamente à eutanásia, prosseguindo com os demais protocolos apenas em fêmeas na fase de diestro.

3.2.1.3. Avaliar os índices morfométricos nos depósitos de tecido adiposo marrom e branco (visceral, retroperitoneal e gonadal), além de confirmar a castração pelo índice uterino.

---

3.2.1.4. Avaliar a oxidação de glicose, síntese de lipídios a partir de glicose, lipólise basal e estimulada por epinefrina nos diferentes depósitos de tecido adiposo marrom e brancos.

### **3.2.2. Artigo 2**

3.2.2.1. Induzir o diabetes experimental pela injeção única de streptozotocina (65mg/kg) e acompanhar se o tratamento de 30 dias interfere no desenvolvimento do diabetes quanto ao ganho de peso e aos sintomas de poliúria, polidipsia e polifagia.

3.2.2.2. Determinar a fase do ciclo estral previamente à eutanásia, prosseguindo com os demais protocolos apenas em fêmeas na fase de diestro.

3.2.2.3. Medir as concentrações circulantes dos hormônios, FSH, LH, progesterona e corticosterona.

3.2.2.4. Medir os índices morfométricos nos tecidos muscular esquelético e hepático.

3.2.2.5. Avaliar o perfil lipídico, glicemia e insulinemia após o tratamento, analisando se os efeitos acompanham os resultados nos parâmetros morfométricos.

3.2.2.6. Verificar a oxidação de glicose, síntese de glicogênio e lipídios a partir de glicose e o conteúdo hepático de glicogênio.

3.2.2.7. Verificar a oxidação de glicose, síntese de glicogênio a partir de glicose, conteúdo de glicogênio no músculo sóleo.

---

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Desenho experimental

Foram realizados dois experimentos independentes, sendo que o primeiro experimento avaliou o efeito do tratamento extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas, e o segundo, o efeito do tratamento com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em ratas submetidas ao modelo de diabetes. Os resultados produzidos foram divididos em dois artigos:

Primeiro artigo: ***Adipose tissue of female Wistar rats respond to Ilex paraguariensis treatment after ovariectomy surgery.***

Segundo artigo: ***Ilex paraguariensis modulates liver metabolism in diabetic female Wistar rats.***

### 4.2. Metodologia do artigo “***Adipose tissue of female Wistar rats respond to Ilex paraguariensis treatment after ovariectomy surgery***”

#### 4.2.1. Animais

Os Animais utilizados foram ratos machos e fêmeas adultos Wistar de 8 semanas de idade da espécie *Rattus norvegicus* provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O número total de animais foi de 60 (N=60), sendo que foram utilizados de 8-10 por grupo. A variação do número de animais ocorreu em virtude da não coincidência do final do tratamento e o diestro do ciclo estral, sendo que foi considerada uma tolerância de 4 dias a mais de tratamento para as fêmeas que não se apresentaram o período desejado do ciclo estral.

O biotério setorial localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS, foi o local de alojamento dos animais. Foram seguidas as condições padrão de biotério, como ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (21°C), umidade relativa do ar de 70%, ração e água à vontade. Os animais receberam ração comercial para roedores (Nuvilab CR1®) durante todo o período experimental.

Todos os pesquisadores envolvidos no manuseio dos animais possuíam treinamento para este fim. Também eram treinados para identificar o desconforto/ sofrimento de animais de laboratório pelas características físicas e comportamentais, visando garantir



---

principalmente o bem-estar animal. As instalações utilizadas apresentam-se em conformidade com a Lei Arouca nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e apresentam credenciamento e acompanhamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA): N°31500

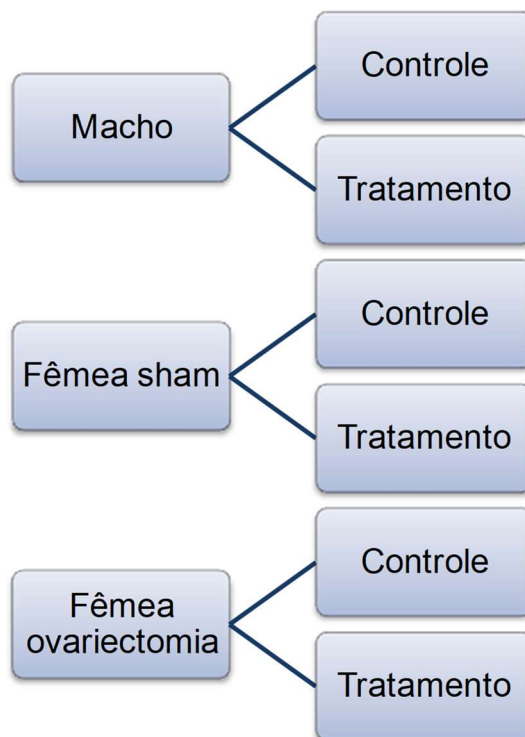
#### **4.2.2. Preparo do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.**

Para a preparação do chá de *Ilex paraguariensis*: foi utilizada uma marca comercial padronizada de um mesmo lote: lote 08/17. O tratamento com extrato foi realizado após o procedimento de ovariectomia.

Foram misturados 75 g de erva-mate comercial a 300 mL de água filtrada, previamente aquecida a 80°C. Foi feita a infusão do extrato por 15 minutos, posteriormente a mistura foi coada, resfriada e administrada por gavagem (volume máximo de 3mL) na dose 1g/kg/dia (DE MENESES FUJII *et al.*, 2014; HUSSEIN *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2014). Essa metodologia de administração visa o estabelecimento de uma dose necessária para detectar as propriedades biológicas do extrato, porém os níveis circulantes dos compostos bioativos não são necessariamente mantidos entre duas doses consecutivas. Essa preparação foi feita diariamente por 45 dias. A administração foi feita sempre ao início do período escuro graças à atividade noturna característica destes animais e visando o consumo em período mais próximo à preparação.

---

Desse modo, foram utilizados 6 grupos experimentais: Macho controle, macho tratamento com extrato, fêmea sham controle, fêmea sham tratamento, fêmea ovariectomia controle, fêmea ovariectomia tratamento (**Figura 6**).



**Figura 6.** Grupos experimentais do experimento *Adipose tissue of female Wistar rats respond to Ilex paraguariensis treatment after ovariectomy surgery*.

#### 4.2.3. Avaliação dos compostos do extrato

##### 4.2.3.1. Metilxantinas

Foi utilizada a metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando um HPLC Shimadzu Prominence 20AT module (Kyoto, Japan) acoplado a um detector fotodiodo PDA SPD-M20A, controlado pelo software LC-Solution Multi-PDA. foi utilizada como fase estacionária uma coluna Gemini RP C18 (Phenomenex, 250 × 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size) acoplada a uma coluna de guarda C18.

As metilxantinas do extrato foram detectadas por HPLC baseado em um método previamente validado (GNOATTO *et al.*, 2007), empregando cafeína e teobromina como controles externos. Os padrões de cafeína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e teobromina (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em solução metanol/água na proporção 30/70 (v/v), nas concentrações de 0,48 a 40,0 µg/mL

---

(caféina) e de 0,495 a 7,005 µg/mL (teobromina). Um sistema isocrático foi empregado, usando metanol/água 30/70 (v/v) como fase móvel. A taxa de fluxo (1.1 mL/min) e temperatura ( $35 \pm 1$  °C) foram mantidos constantes durante as análises, que levou 10 minutos. A detecção foi feita a 280nm. Todas as amostras foram propriamente diluídas em metanol/água 30/70 (v/v) dentro da linearidade das curvas-padrão. O conteúdo total de metilxantinas foi expresso como a soma das concentrações de caféina e teobromina.

#### **4.2.3.2. Fenóis totais**

Os fenóis totais do extrato foram verificados pelo método de Folin-Ciocalteu (ALEXANDRA DE ANDRADE *et al.*, 2007), e o conteúdo total de fenóis foi determinado pela reação colorimétrica do reagente de Folin-Ciocalteu (amarelo) com os compostos fenólicos da amostra, formando um complexo azul, onde substâncias redutoras estão presentes (compostos fenólicos). 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu foi adicionado a 0,5 mL de amostra. Após, 0,5 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 10% foi adicionado e após 30 min em temperatura ambiente, a leitura foi feita. Como padrões externos, foi utilizado o ácido gálico (Sigma-Aldrich) em concentrações de 2,0 a 6 µg/mL após a dissolução em água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu spectrophotometer) em 760 nm. Os valores estão expressos em equivalentes de ácido gálico.

#### **4.2.4. Cirurgia de castração**

A cirurgia consistiu na remoção cirúrgica dos ovários das fêmeas destinadas aos grupos ovariectomia. As fêmeas foram anestesiadas (xilazina 5 mg/kg e cetamina 100 mg/kg) administradas por via intraperitoneal. A verificação da indução correta do plano anestésico foi feita através da verificação do reflexo flexor do membro contralateral ao local da injeção dos anestésicos e pelo padrão ventilatório. Após foi feita a tricotomia e assepsia da região cirúrgica. A rata foi posicionada em decúbito ventral e foi feita uma incisão entre o rebordo costal inferior e a coxa e a uma distância de cerca de 1 cm, lateralmente, da linha mediana. A incisão da pele e do tecido subcutâneo deixou à mostra a parede muscular, que foi afastada até o acesso à cavidade abdominal. O ovário foi localizado em meio a tecido adiposo. O ovário foi retirado após ligadura da tuba uterina correspondente, seccionando entre a ligadura

---

e o ovário. Foi realizada a sutura do músculo e posteriormente da pele. Para a retirada do segundo ovário, este procedimento foi repetido contra lateralmente (LASOTA; DANOWSKA-KLONOWSKA, 2004).

Após a cirurgia os animais foram acompanhados em local aquecido, individualizados, até a total recuperação da anestesia para retorno a biotério setorial. Diariamente foram acompanhadas pela inspeção e limpeza do local da cirurgia, verificadas quanto aos sinais de dor e medicadas com dipirona (300mg/kg v.o.). As fêmeas dos grupos sham também passaram pela anestesia, pelo processo cirúrgico e acompanhamento, exceto a remoção dos ovários.

#### **4.2.5. Verificação do ciclo estral das ratas**

As fases do ciclo estral foram determinadas utilizando o critério a morfologia celular do epitélio vaginal. Predominam nas amostras de proestro células epiteliais nucleadas; no estro, células epiteliais cornificadas; no metaestro, células epiteliais nucleadas e leucócitos; e no diestro, leucócitos. (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007)

Todas as fêmeas utilizadas neste experimento foram eutanásias em diestro, período mais longo do ciclo e quando não há picos hormonais individuais de estradiol, progesterona, FSH ou LH. Esta abordagem permite menor variação metabólica referente ao ciclo estral, mas sim em relação à intervenção e/ou tratamento.

#### **4.2.6. Eutanásia**

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos que posteriormente analisados. O método escolhido para eutanásia baseou-se no fato deste ser um método eficaz que produz alterações fisiológicas mínimas nos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com nossos protocolos, pois todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores, o que, pode se tornar um viés deste estudo, pois, dentro outros fatores, verificaremos o impacto do tratamento sobre o metabolismo de carboidratos (BROWN *et al.*, 2005; SAHA *et al.*, 2005).

---

Ainda os procedimentos ocorrem conforme o guia de eutanásia da associação americana de medicina veterinária em sua edição de 2013 (AVMA, 2013).

#### **4.2.7. Morfometria dos tecidos**

Os tecidos adiposo marrom, adiposo branco visceral, retroperitoneal e gonadal e o útero dos animais foram retirados, rapidamente secos e pesados. O índice tecidual está expresso como a relação entre o peso do órgão/tecido e o peso do animal (RESENDE *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2011).

#### **4.2.8. Parâmetros do soro**

O sangue foi coletado, o soro separado por centrifugação a 2150 g por 8 min. Os parâmetros avaliados (colesterol total, glicose e triglicerídeos) seguiram o protocolo dos kits comerciais colorimétricos conforme indica o fabricante (Labtest®, Minas Gerais, Brazil).

#### **4.2.9. Conversão de glicose a CO<sub>2</sub>**

Os tecidos foram coletados e colocados em solução fisiológica gelada. Em seguida, foram transferidos para tubos com meio de incubação contendo 0,10 µCi de D-U-<sup>14</sup>C-glicose e 5 mM de glicose não marcada, além de um poço para captação de CO<sub>2</sub> com papel 3 MM-Whatman. A fase gasosa foi substituída com carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 95:5% v/v), os tubos fechados e vedados. Após incubação a 37°C por uma hora, a reação de oxidação foi interrompida injetando-se TCA 50% no meio de incubação, através da tampa de borracha, e NaOH nos poços de captação do CO<sub>2</sub>. A reação de captação do <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> ocorreu *overnight* e a determinação da formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> foi feita de acordo com Torres *et al.*(2001). O conteúdo de CO<sub>2</sub> foi medido em contador LKB-Wallac com 95% de eficiência. Os resultados estão expressos como µmol de <sup>14</sup>C-glicose incorporada em CO<sub>2</sub> por grama de tecido por hora (BUENO; AZZOLIN; PERRY, 1994).

#### **4.2.10. Conversão de glicose em lipídios**

Após o ensaio de conversão de glicose a CO<sub>2</sub>, os tecidos foram destinados para a avaliação da produção de lipídios a partir de glicose marcada, sendo que a massa de tecido destinada para este fim foi novamente verificada por pesagem.

---

Os tecidos foram homogeneizados em solução clorofórmio- metanol (2:1) (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957). Após, foi adicionada solução salina (NaCl 0,9%) e os tubos centrifugados por 10 min a 2000g. A fração de clorofórmio foi coletada para leitura. Este processo foi repetido 3 vezes e procedeu-se a contagem da radioatividade no contador LKB-Wallac com 95% de eficiência. A lipogênese a partir de glicose está expressa como  $\mu\text{mol}$  de  $^{14}\text{C}$ -glicose convertido em lipídeos por grama de tecido por hora.

#### **4.2.11. Lipólise basal e estimulada**

Amostras de tecido adiposo foram coletadas e incubadas em frascos com solução fisiológica (Ringer Bicarbonato, pH 7,4) contendo 1% de albumina bovina sem ácido graxo, 5mM de glicose e solução de adrenalina e ácido ascórbico ( $2,5 \times 10^{-4}\text{M}$ ). A fase gasosa dos tubos foi substituída por  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  nas concentrações 95% e 5%, respectivamente, e as amostras incubadas por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após a incubação, o meio de foi coletado e guardado em tubos tipo minitubo para posterior dosagem de glicerol (DOS SANTOS *et al.*, 2012).

A condição lipólise basal corresponde à incubação em Ringer Bicarbonato, enquanto a lipólise estimulada corresponde à incubação em Ringer Bicarbonato e epinefrina (12,5mM).

#### **4.2.12. Análise Estatística**

O software GraphPad Prism ® versão 6.01 foi utilizado como ferramenta para análise dos dados. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão da média (SD). As diferenças entre os grupos dos machos foram testadas por teste T (controle vs tratamento) e das fêmeas por análise de variância (ANOVA) de duas vias (sham vs sham tratamento vs ovariectomia vs ovariectomia tratamento) seguida de pós-teste de Tukey. Comparações com  $P < 0.05$  foram consideradas significativas. Dados não paramétricos estão expressos como mediana e quartis 25/75. Dados dos machos foram avaliados usando teste de Mann-Whitney e das fêmeas, Kruskal Wallis (KW) seguido pelo pós-teste de Dunn.

A lipólise foi avaliada por ANOVA de medidas repetidas (basal vs estimulada em cada grupo) seguida do pós-teste de Sidak .os dados paramétricos foram analisados pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunn.

---

### **4.3. Metodologia do artigo “*Ilex paraguariensis* modulates liver metabolism in diabetic female Wistar rats”**

#### **4.3.1. Animais**

Os Animais utilizados foram ratos adultos Wistar fêmeas de 8 semanas de idade da espécie *Rattus norvegicus*. O número total de animais foi de 36 (N=36), sendo que foram utilizados de 5-9 por grupo no experimento. A variação do número de animais ocorreu em virtude da não coincidência do final do tratamento e o diestro do ciclo estral, sendo que foi considerada uma tolerância de 4 dias a mais de tratamento para as fêmeas que não se apresentaram o período desejado do ciclo estral. Além disso, a resistência ao protocolo de indução do diabetes também contribuiu com essa variação.

O local e as condições de alojamento seguiram os mesmos padrões descritos no item 4.2.1. Do mesmo modo, o manuseio e a atenção às diretrizes éticas apresentam-se em conformidade com a Lei Arouca nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e apresentam credenciamento e acompanhamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### **4.3.2. Indução do diabetes**

A indução do diabetes foi feita pela injeção intraperitoneal única de estreptozotocina na dose de 65mg/kg, diluída em tampão Citrato (0,1M). A efetividade da indução do modelo foi avaliada 48h após pela verificação da glicemia superior a 250mg/dL (TANCRÈDE; ROUSSEAU-MIGNERON; NADEAU, 1983).

#### **4.3.3. Preparo do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis***

Para a preparação do chá de *Ilex paraguariensis*: foi utilizada uma marca comercial padronizada de um mesmo lote: lote /12/17/3. O material vegetal utilizado foi de fonte indústria ervateira e o registro de acesso ao patrimônio genético está em curso no sistema SisGen. O tratamento com extrato foi realizado após o procedimento de indução do diabetes.

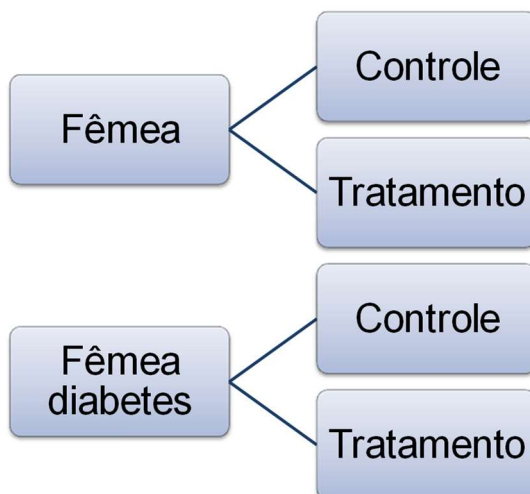
Foram misturados 70g de erva-mate comercial a um litro de água filtrada previamente aquecida a 80°C. Foi feita a infusão do extrato por 15 minutos, posteriormente a mistura foi coada, resfriada e disponibilizada *ad libitum* como única fonte hídrica. Essa

---

preparação foi feita diariamente por 30 dias. Essa metodologia de administração visa um *screening* inicial das propriedades bioativas do extrato, não havendo necessidade de nova administração de dose nas 24h em que o extrato fica disponível. A administração foi feita sempre ao início do período escuro graças à atividade noturna característica destes animais e visando o consumo em período mais próximo à preparação.

Os animais diabéticos receberam o extrato diluído 3 vezes, levando em consideração o maior consumo hídrico destes animais.

Desse modo, foram utilizados 4 grupos experimentais: Fêmea controle, fêmea tratamento, fêmea diabetes controle, fêmea diabetes tratamento. (**Figura 7**)



**Figura 7.** Grupos experimentais do experimento *Ilex paraguariensis* modulates liver metabolism in diabetic female Wistar rats

#### 4.3.4. Avaliação dos compostos do extrato

A avaliação do teor de metilxantinas e fenóis totais foi realizada pelo mesmo método descrito no item 4.2.3.

#### 4.3.5. Verificação do ciclo estral das ratas

As fases do ciclo estral foram determinadas conforme descrito no item 4.2.5. Todas as fêmeas utilizadas neste experimento também foram eutanásias em diestro.

#### 4.3.6. Eutanásia

Assim como no descrito no item 4.2.6., os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos que posteriormente analisados. Ainda os procedimentos ocorreram conforme o guia de



---

eutanásia da associação americana de medicina veterinária em sua edição de 2013 (AVMA, 2013).

#### **4.3.7. Morfometria dos tecidos**

Os tecidos hepático e muscular dos animais foram retirados, rapidamente secos e pesados. O índice tecidual está expresso como a relação entre o peso do órgão/tecido e o peso do animal

#### **4.3.8. Parâmetros do soro**

O sangue foi coletado, o soro separado por centrifugação a 2150 g por 8 min. Os parâmetros avaliados (colesterol total, glicose, triglicerídeos, HDL-colesterol e glicerol) seguiram o protocolo dos kits comerciais colorimétricos conforme indica o fabricante (Labtest<sup>®</sup>, Minas Gerais, Brazil).

Insulina, estradiol, FSH, LH, progesterona e corticosterona foram avaliados por radioimunoensaio. O ensaio consiste na competição entre a substância de interesse e a mesma substância já marcada com radioisótopo por um receptor comum.

#### **4.3.9. Conversão de glicose a CO<sub>2</sub>**

Os tecidos foram coletados e colocados os mesmos procedimentos descritos no item **4.2.9** foram realizados.

#### **4.3.10. Captação de glicose**

Para a avaliação da captação de glicose, os tecidos foram pesados, fatiados e colocados em um tubo contendo solução fisiológica (Krebs-Ringer Bicarbonato) com 0,1 µCi de 2-deoxi-D-[1-14C]-glicose (55mCi/mmol -Amersham International). Os tubos foram mantidos em gelo e a fase gasosa substituída por O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> nas concentrações 95% e 5%, respectivamente. A incubação do ensaio de captação ocorreu em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante por 1 hora à temperatura de 37°C. O meio de incubação foi reservado para verificação da quantidade de glicose não captada (Meio). Os tecidos foram, então, retirados do meio de incubação, lavados com ringer, secos em papel filtro, colocados em água destilada e posteriormente congelados e fervidos para ruptura das células. A contagem da quantidade de glicose captada pelo tecido (Tecido) foi feita a partir de 100µl

---

deste meio. A medida da radioatividade foi feita após adição de líquido de cintilação e quantificação em contador LKB-Wallac e os resultados da captação, expressos pela razão Tecido/Meio: dpm/mL tecido por grama de dividido por dpm/mL do meio de incubação (razão T/M), conforme Machado *et al.* (1991).

#### **4.3.11. Conversão de glicose em lipídios**

O ensaio de conversão de glicose a lipídios a partir de glicose marcada foi realizado conforme o item **4.2.10**.

#### **4.3.12. Conversão de glicose em glicogênio**

Após o ensaio de conversão de glicose a CO<sub>2</sub>, os tecidos foram destinados para a avaliação da produção de glicogênio a partir de glicose marcada, sendo que a massa de tecido destinada para este fim foi novamente verificada por pesagem.

Os tecidos foram expostos a uma solução de KOH 30% a 100°C para a extração do glicogênio tecidual. Posteriormente o glicogênio foi obtido por precipitação em etanol 96° e lavagem com água destilada. O glicogênio resultante foi solubilizado em água e líquido de cintilação. A quantidade de glicogênio constituído de carbono marcado (<sup>14</sup>C-glicogênio), mensurada em contador LKB-Wallac com 95% de eficiência. A lipogênese a partir de glicose está expressa como μmol de <sup>14</sup>C-glicose convertida a lipídeo por grama por hora.

#### **4.3.13. Glicogênio tecidual**

Para as amostras de tecido destinadas para análise da concentração tecidual de glicogênio, o tecido foi digerido com KOH 30% a 100°C, o glicogênio foi precipitado em solução alcoólica, lavado em água destilada e convertido à glicose por exposição a HCl 4M a 100°C. A glicose resultante deste processo foi medida com o kit comercial colorimétrico (LabTest®). A concentração de glicogênio está expressa como mg de glicogênio por 100 gramas de tecido (mg%).

#### **4.3.14. Produção de glicose a partir de alanina**

Fatias de tecido (100±10mg) foram incubadas a 37 °C por 1 h em tubos contendo Ringer Bicarbonato (pH 7.4) na presença de 0.1 μCi de [U-<sup>14</sup>C]-alanina

---

(151mCi/mmol; Perkin Elmer) e 5 mM alanina não marcada. A atividade gliconeogênica foi determinada através da medida da incorporação de  $^{14}\text{C}$ -alanine em  $^{14}\text{C}$ -glicose. O meio foi desproteinizado e a  $^{14}\text{C}$ -glicose foi separada por cromatografia de camada delgada, usando n-butanol/95%; ethyl alcohol/5.4%; ácido acético em água (75:47.4:27.6, v/v/v). A área correspondente à glicose foi localizada após exposição com solução de anisaldeído (95% etanol/ácido sulfúrico concentrado/p-metoxibenzaldeído 18:1:1, v/v/v), e raspada para dissolução em líquido de cintilação (tolueno – Triton X®-100 (2:1, v/v); 2,5-difeniloxazol (0.4%, v/v) e 2-p-phenylenebis 5-phenyloxazol (0.01%v/v), e a radioatividade medida contador de cintilação líquida (LKB-Wallac, Perkin Elmer, WALTHAM, MA, USA). A atividade de gliconeogênese estão expressos como  $\mu\text{mol}$  de  $^{14}\text{C}$ -alanine convertida em glucose por grama por hora.

#### **4.3.15. Análise estatística**

O software GraphPad Prism ® versão 6.01 foi utilizado como ferramenta para análise dos dados. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão da média (SD). As diferenças entre os grupos por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. Comparações com  $P < 0.05$  foram consideradas significativas. Dados não paramétricos estão expressos como mediana e quartis 25/75. Dados avaliados usando teste Kruskal Wallis (KW) seguido pelo pós-teste de Dunn.

---

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Primeiro artigo**

**Título: Adipose tissue of female Wistar rats respond to *Ilex paraguariensis* treatment after ovariectomy surgery**

**Periódico: Journal of Traditional and Complementary Medicine (ISSN 2225-4110)**

**Status: Aceito para publicação (doi: 10.1016/j.jtcme.2020.07.002)**

1 **Title: Adipose tissue of female Wistar rats respond to *Ilex paraguariensis***  
2 **treatment after ovariectomy surgery**

3 Authors: Débora Santos Rocha<sup>1\*</sup>, Jorge Felipe Argenta Model<sup>1</sup>, Maiza Von Dentz<sup>1</sup>,  
4 Jéssica Maschio<sup>1</sup>, Renata Ohlweiler<sup>1</sup>, Matheus Vieira Lima<sup>1</sup>, Samir Khal de Souza<sup>1</sup>,  
5 Elaine Sarapio<sup>1</sup>, Éverton Lopes Vogt<sup>1</sup>, Mairique Waszczuk<sup>2</sup>, Simony Martiny<sup>2</sup>,  
6 Valquíria Linck Bassani<sup>2</sup>, Luiz Carlos Kucharski<sup>1</sup>

7 <sup>1</sup> Physiology Department. Federal University of Rio Grande do Sul - Sarmiento Leite,  
8 500 - 90050-170- Porto Alegre - Rio Grande do Sul- Brazil. Phone number: +55 51  
9 33083623

10 <sup>2</sup> Faculty of Pharmacy. Federal University of Rio Grande do Sul – Av. Ipiranga, 2752 -  
11 90610-000- Porto Alegre - Rio Grande do Sul- Brazil.

12 **\*Corresponding author: Débora Santos Rocha (Master's degree).**

13 **Sarmiento Leite, 500 - 90050-170- Porto Alegre - Rio Grande do Sul- Brazil.**

14 **Phone/fax number: +55 51 33083623**

15 **e-mail: [debora.rocha@ufrgs.br](mailto:debora.rocha@ufrgs.br)**

16 **Conflict of Interest statement:** none.

17 **List of Abbreviations:** BAT: brown adipose tissue; Epi: epinephrine; KRB: Krebs  
18 ringer bicarbonate buffer; WAT: White adipose tissue; WATv: visceral white adipose  
19 tissue; WATr: retroperitoneal white adipose tissue; WATg: gonadal white adipose  
20 tissue

21 **Keywords:** Adipose tissue; Female; *Ilex paraguariensis*; Lipid metabolism;  
22 Ovariectomy

---

23 **Highlights**

- 24 • *Ilex paraguariensis* reduced weight gain of ovariectomy females to control levels
- 25 • Serum triglycerides decreased in male and estrogen-deficient female after  
26 treatment
- 27 • Treatment restored glucose oxidation and lipogenesis of estrogen-deficient  
28 females
- 29 • *I. paraguariensis* decreased lipolysis response in visceral adipose tissue of  
30 males

31 **Type of Article:** Original Research article

32 **Length of the Manuscript** Title: 90 characters; Abstract: 213 words; Text: 5108 words;  
33 References: n. 48; Figures and Tables: n. 5 ; Supplementary files: n. 0

34 **Section:** Dietary therapy/nutrients supplements

35 **Taxonomy:** Carbohydrate Metabolism Disorder, Disorder of Lipid Metabolism,  
36 Fat Distribution Syndrome, Animal Model of Metabolism, Gender Difference in  
37 Metabolism

---

## Abstract

38

39 **Background and Aim:** Metabolic disturbances are known for their increasing  
40 epidemiological importance. *Ilex paraguariensis* presents a potential option for  
41 mitigating lipid metabolism imbalance. However, most of the literature to date has not  
42 considered sex bias. This study aimed to evaluate the effect of *Ilex paraguariensis* on  
43 the metabolism of different adipose tissue depots in males and females.

44 **Experimental procedure:** After ovariectomy, female Wistar rats received daily  
45 treatment with the extract (1g/kg) for forty-five days. Biochemical serum parameters  
46 and tissue metabolism were evaluated. Oxidation, lipogenesis and lipolysis were  
47 evaluated in brown, white visceral, retroperitoneal and gonadal adipose tissues.

48 **Results and Conclusion:** The results showed that treatment with the extract led to a  
49 reduced weight gain in ovariectomised females in comparison to control. The  
50 triglyceride concentration was decreased in males. Glucose oxidation and lipid  
51 synthesis in visceral and retroperitoneal adipose tissues were restored in  
52 ovariectomised females after treatment. The response to epinephrine decreased in  
53 visceral adipose tissue of control males; however, lipolysis in females did not respond  
54 to ovariectomy or treatment. These findings highlight the enormous potential effects of  
55 *I. paraguariensis* on lipid metabolism, modulating lipogenic pathways in females and  
56 lipolytic pathways in males. Furthermore, the sex approach applied in this study  
57 contributes to more effective screening of the effects of *I. paraguariensis* bioactive  
58 substances.

59 **Keywords:** Adipose tissue; Female; *Ilex paraguariensis*; Lipid metabolism;  
60 Ovariectomy

61

---

## 62 1. Introduction

63 Yerba mate (*Ilex paraguariensis*, A. St. Hil., 1822) is a perennial tree belonging to the  
64 “holly” family (Aquifoliaceae). It is native to South America and is commonly found in  
65 Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay. These population of these countries widely  
66 consumes a tea-like beverage called *mate*, which is prepared with the leaves and  
67 stems of *Ilex paraguariensis*. In addition to containing compounds with nutritional  
68 relevance, mate contains methylxanthines, saponins and polyphenols and these  
69 bioactive fractions are relevant for human health research <sup>1</sup>.

70 Regarding the extract’s effects on energy metabolism, several studies have indicated  
71 its use as a preventive/therapeutic agent against metabolic syndrome and obesity. As  
72 observed in previous studies,<sup>2</sup> insulin levels do not appear to be affected by the extract  
73 in male control rats. This was confirmed in the present study, but for the first time in  
74 control e ovariecomisated female rats. *Ilex paraguariensis* has been shown to  
75 attenuate weight gain, body mass index, waist-hip ratio and the percentage of body fat  
76 in humans (men and women were analysed together) after a 12-week treatment.<sup>3</sup> Also  
77 in humans, the mate extract was able to modify the respiratory quotient, indicating an  
78 increase in fat oxidation and anti-obesity potential.<sup>4</sup> The extract reduces weight gain in  
79 rats after the consumption of a hyperlipidaemic diet, decreases visceral white adipose  
80 tissue (WATv) mass, blood insulin, glucose, leptin levels and has been shown to  
81 improve the inflammatory profile in liver and muscle. <sup>5,6</sup> The same has been found in  
82 C57BL/6J mice with diet-induced obesity, where *Ilex paraguariensis* improves the  
83 energetic profile of obese mice, increasing energy expenditure, improving performance  
84 in the oral glucose tolerance test, and decreasing blood triglycerides, free fatty acids,  
85 leptin, insulin and cholesterol, as well as causing upregulation of thermogenic genes  
86 in WAT <sup>7</sup>.

87 Metabolic syndrome is a critical pathological condition and involves failures in the  
88 cardiovascular system, pancreas and liver, which leads to the main causes of death  
89 within individuals with this condition: cardiovascular disease, type 2 diabetes mellitus  
90 and cirrhosis, among others.<sup>8</sup> World authorities have emphasised their concern about  
91 metabolic syndrome because of its significant contribution to the development of  
92 metabolic comorbidities. Scientific efforts that favour the prevention and treatment of



---

93 this disease are quite valid since they can significantly improve the population's quality  
94 of life, as well as reducing public health expenditure.  
95 However, most of these studies addressing metabolic syndrome have not yet explored  
96 sex bias. Obesity affects both men and women,<sup>9,10</sup> but the distribution of fat depots,  
97 energy stock and mobilisation and adipokine secretion show very different patterns  
98 between males and females in humans and rodents.<sup>10-12</sup> Circulating sex steroid  
99 concentrations alter such factors considerably, leading to androgen and gynoid  
100 patterns of adipose tissue.<sup>13</sup> Consequently, the search for new therapeutic agents  
101 should involve females/women in study samples, so that basic and clinical research  
102 can have better application in the future.

103 Therefore, faced with the alarming prevalence of metabolic syndrome, the potential  
104 use of *I. paraguariensis* extract as a preventive/treatment agent for this condition and  
105 the sex dimorphism of adipose tissue, the aim of this study was to evaluate the  
106 metabolism of different adipose tissue depots, evaluating male and female Wistar rats  
107 separately, after treatment with yerba mate aqueous extract.

## 108 **2. Methods**

### 109 2.1. Animals and experimental design

110 Fifty-five (N=55) male and female Wistar rats (8 weeks old) were housed in groups of  
111 three per cage, under light/dark cycles of 12 h, at 22 ± 2 °C. All rats were fed with a  
112 commercial diet (Nuvilab CR1®) and had access to food and water *ad libitum*. Rats  
113 were divided into six groups: male control (C), male treated with mate (CT), female  
114 sham (S), female sham treated with mate (ST), female ovariectomy (OV) and female  
115 ovariectomy treated with mate (OVT), totalling 8-10 individuals per group. All animal  
116 procedures were performed by trained staff to ensure the well-being of the animals.

### 117 2.2. Ovariectomy protocol

118 Female rats received Ketamine (90mg/kg) and Xylazine (10mg/kg) intraperitoneally.  
119 Two midline dorsal skin incisions were made. The ovarian vessels were clamped, and  
120 the ovaries removed. Then, the uterine tubes were ligated, and the muscles and skin  
121 sutured. Dipyrone (200mg/kg) was given for analgesia. The sham groups also received

---

122 anaesthesia and analgesia, and the ovaries were exposed but returned to the  
123 abdominal cavity. After recovery, treatment was performed.

### 124 2.3. Plant materials and aqueous extract preparation

125 The mate aqueous extract was prepared as follows: 300 mL of filtered water was  
126 heated up to 80 °C, then 75 g of commercial yerba mate (Ervateira Barão de Cotegipe,  
127 RS, Brazil/ Lot 08/17) was added, and left to infuse for 15 min, then filtered and left to  
128 cool. Immediately after preparation, the extract was administered by gavage  
129 (1g/kg/day). The preparation was made daily for forty-five days in the late afternoon,  
130 due to the nocturnal habits of the animals, for the extract to be administered at the time  
131 of awakening.

### 132 2.4. Euthanasia and tissue procedures

133 After treatment, animals were weighed and decapitated. The results presented here  
134 regarding the females correspond to the dioestrus phase of their cycles. The brown  
135 adipose tissue (BAT), visceral adipose tissue (WATv), retroperitoneal adipose tissue  
136 (WATr), gonadal adipose tissue (WATg) and serum were collected and processed  
137 according to oxidation, lipogenesis and lipolysis protocols. The morphometric  
138 parameters were expressed as tissue index (tissue weight/body weight). All euthanasia  
139 proceedings followed the NIH publication: Guide for the Care and Use of Laboratory  
140 Animals and were approved by the Research Ethics Committee (Universidade Federal  
141 do Rio Grande do Sul Research System, protocol number: 31500).<sup>14</sup>

### 142 2.5. Measuring aqueous extract compounds

143 The same aqueous extract provided to the animals during treatment was used in the  
144 following procedures.

#### 145 2.5.1. Methylxanthines

146 An HPLC Shimadzu Prominence 20AT module (Kyoto, Japan) coupled to a photodiode  
147 array detector (PDA) SPD-M20A, controlled by LC-Solution Multi-PDA software, was  
148 used. A Gemini RP C18 column (Phenomenex, 250 × 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size)  
149 coupled with a C18 guard column was used as the stationary phase.

150 Methylxanthines were assayed by HPLC based on a previously validated method  
151 employing caffeine and theobromine as external standards.<sup>15</sup> The theobromine  
152 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and caffeine (Sigma-Aldrich) standards were

---

153 properly dissolved in methanol: water 30/70 (v/v), at concentrations ranging from 0.48  
154 to 40.0 µg/mL (caffeine) and from 0.495 to 7.005 µg/mL (theobromine). An isocratic  
155 system was employed, using methanol/water 30/70 (v/v) as the mobile phase. The flow  
156 rate (1.1 mL/min) and temperature ( $35 \pm 1$  °C) were kept constant throughout the  
157 analysis, which took 10 minutes. The detection was performed at 280 nm. All samples  
158 were properly diluted with methanol/water 30/70 (v/v) seeking the linearity range of  
159 standard curves. The total methylxanthine content was determined by the sum of  
160 caffeine and theobromine individual concentrations. A representative chromatogram of  
161 methylxanthine (caffeine and theobromine) dosage in lot 07/18 of the *Ilex*  
162 *paraguariensis* aqueous extract is shown in Additional file 1.

### 163 2.5.2. Total Phenols

164 The total phenols from yerba mate were assayed by the Folin-Ciocalteu method,<sup>16</sup>  
165 and the total phenol content was determined by the colorimetric reaction of Folin-  
166 Ciocalteu reagent (yellow) to a blue complex when reductive agents were present  
167 (phenolic compounds). 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent was added to 0.5 mL of the  
168 sample. Then 0.5 mL of sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 10% was added, and after 30 min  
169 at room temperature, the measurement was made. Gallic acid (Sigma-Aldrich) was  
170 used as the external standard at concentrations ranging from 2.0 to 6 µg/mL, after  
171 dissolution in distilled water. The absorbance was measured in a spectrophotometer  
172 (UV-1800 Shimadzu spectrophotometer) at 760 nm wavelength. Values are expressed  
173 as gallic acid equivalents.

### 174 2.6. Serum parameters

175 Blood was collected in serum prepared tubes, then centrifuged (2150 g /8 min). Total  
176 cholesterol, glucose and triglycerides were determined using commercial enzymatic  
177 kits (Labtest ®, Minas Gerais, Brazil).

### 178 2.7. <sup>14</sup>C glucose incorporation into <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>

179 The <sup>14</sup>C glucose incorporation into <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was performed following a validated method.  
180 <sup>17</sup> In brief, tissue samples were sliced and incubated at 37 °C for 60 min in flasks sealed  
181 with rubber caps containing KRB (Bicarbonate Krebs–Ringer buffer, pH 7.4), 0.1 µCi  
182 [U-<sup>14</sup>C] glucose (55 mCi/mmol, Amersham, Little Chalfont, UK), and glucose 5 mM.  
183 The gaseous phase was exchanged with a 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> mixture. Small glass  
184 wells containing strips of 3 MM-Whatman paper were placed above the level of the  
185 incubation medium (<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> wells). The assay was stopped by injecting 0.25 mL of

---

186 trichloroacetic acid solution 50% (v/v) through the rubber caps, and 0.25 mL of NaOH  
187 (2.0 M) solution into the  $^{14}\text{CO}_2$  wells. The flasks were maintained for 12 h at room  
188 temperature in order to capture  $^{14}\text{CO}_2$  in the 3 MM-Whatman paper. The paper  
189 contents were transferred to vials containing a liquid scintillation mixture (toluene –  
190 Triton X®-100 (2:1, v/v); 2,5-diphenyloxazole (0.4%, v/v) and 2-p-phenylenebis 5-  
191 phenyloxazole (0.01% v/v), and radioactivity was measured using a liquid scintillation  
192 counter (Tri-Carb 4910TR liquid scintillation counter, Perkin Elmer, MA, USA). Results  
193 were expressed as nmol of  $^{14}\text{C}$  glucose incorporated into  $\text{CO}_2$  per gram of tissue per  
194 hour.

#### 195 2.8. $^{14}\text{C}$ -glucose incorporation into lipid assay

196 Samples from the  $^{14}\text{C}$  glucose incorporation into  $^{14}\text{CO}_2$  assay were homogenised with  
197 chloroform: methanol 2:1 (v/v), followed by lipid extraction performed according to  
198 Folch et al. (1957).<sup>18</sup> Next, saline solution (NaCl 0.9%) was added, and tubes were  
199 centrifuged for 10 min at 2000g. The chloroform phase was reserved for evaporation,  
200 and a scintillation liquid mixture was added. The results were expressed as nmol  $^{14}\text{C}$   
201 glucose converted to lipid per gram of tissue per hour.

#### 202 2.9. Lipolysis assay

203 Sample tissues were incubated in KRB (pH 7.4) at 37 °C for 60 min under two different  
204 conditions: basal and stimulated. The basal condition corresponded to incubation in  
205 KRB, whereas the stimulated (Epi) corresponded to incubation in KRB plus  
206 epinephrine (12.5mM). The samples were assessed through glycerol released into the  
207 incubation medium using a UV-method commercial kit (Enzytec™ Fluid Glycerol).  
208 Results were expressed as microgram of glycerol released per gram of tissue ( $\mu\text{g/g}$ ).

209 <sup>19</sup>

#### 210 2.10. Statistical analyses

211 Results were expressed as the mean and respective standard deviation (SD).  
212 Differences among groups were tested by a T-test for male groups (C and CT) and  
213 two-way ANOVA for female groups (S, ST, OV and OVT) followed by Tukey post hoc  
214 test (Prism® software, 6 edition). Values of  $P < 0.05$  were considered significant.  
215 Nonparametric data were tested using the Mann-Whitney test for males and Kruskal  
216 Wallis (KW) for females, followed by Dunn's post hoc test. Data are expressed by the  
217 median and interquartile range (IQR).

---

218 Lipolysis data were evaluated by *two-way* ANOVA of repeated measures followed by  
219 Sidak's post hoc test, and nonparametric data were analysed by the Friedman test and  
220 Dunn's post hoc.

### 221 **3. Results**

#### 222 3.1. Aqueous extract compounds

223 Total polyphenols and methylxanthines (caffeine and theobromine) are the major  
224 components present in *Ilex paraguariensis*' extract (Lot 08/17). The extract presented  
225 with  $5.244 \pm 0.124$  g% of total phenols (expressed as gallic acid equivalents). Caffeine  
226 and theobromine were present at  $1.077 \pm 0.038$  and  $0.197 \pm 0.007$  g%, respectively.

#### 227 3.2. Serum and morphometric parameters

228 **Table 1** shows serum and morphometric data. The extract was able to reduce the  
229 triglyceride content in males, and OVT females were determined to have lower levels,  
230 as compared to the sham group, by the post hoc test.

231 Regarding the evaluated morphometric parameters, it was observed that the uterus of  
232 ovariectomised females presented with a considerable weight decrease. Given that  
233 uterine weight maintenance is higher contingent to oestrogen levels, the ovariectomy  
234 procedure was successful (**Table 1**).

235 The weight gain in males remained unchanged after treatment. However, the mate  
236 extract attenuated the weight gain in ovariectomised females. On the other hand, the  
237 BAT, WATr and WATg tissue indexes were not different in males or females after  
238 treatment. Female groups treated with mate showed a decrease in WATv index  
239 according to ANOVA, but no differences were found in the post hoc test. WATg  
240 presented with the same pattern as WATv, and only S and OVT groups showed  
241 differences in the post hoc test.

#### 242 3.3. Brown adipose tissue metabolism

243 **Figure 1** shows BAT metabolism. The incorporation of glucose into CO<sub>2</sub> or lipids in  
244 females did not change with treatment in BAT (**Figure 1D, 1E**). Males did not respond  
245 significantly to treatment in regard to these parameters (**Figure 1A, 1B**). No differences  
246 were found regarding CO<sub>2</sub> production or lipogenesis.

247 Intrinsic lipolysis did not change in females (**Figure 1F**). Furthermore, the extract was  
248 unable to change the response to epinephrine in BAT. Therefore, both males and

---

249 females demonstrated a response to epinephrine and the lipolysis response remained  
250 pronounced (**Figure 1C, 1F**).

#### 251 3.4. Visceral adipose tissue metabolism

252 **Figure 2** shows the WAT<sub>v</sub> metabolism. The incorporation of glucose into CO<sub>2</sub> was not  
253 different in CT (**Figure 2A**). However, OVT females had a significant decrease in this  
254 parameter in WAT<sub>v</sub> after 45 days. After treatment with mate extract, these levels  
255 returned to the values found in S and ST (**Figure 2D**).

256 The incorporation of glucose into total lipids presented the same response pattern to  
257 treatment. Males did not seem to respond. OVT females showed a significant reduction  
258 in this parameter, with the extract promoting the restoration of values found in control  
259 rats (**Figure 2B, 2E**).

260 No difference in basal lipolysis was observed in either control or treated males and  
261 females (**Figure 2C, 2F**). As for the control animals, there was an effect of epinephrine  
262 as a lipolysis stimulant in WAT<sub>v</sub> males, but this was not apparent in females. The  
263 extract's effect in CT promoted a lack of responsiveness to epinephrine, while in  
264 females the response remained the same. That is, the extract promoted a lack of  
265 response to epinephrine in males. OV and OVT rats showed no changes (**Figure 2C,**  
266 **2F**).

#### 267 3.5. Retroperitoneal adipose tissue metabolism

268 **Figure 3** shows WAT<sub>r</sub> metabolism. The treatment response was the same for  
269 incorporation of glucose into CO<sub>2</sub> and lipids. The incorporation of glucose into CO<sub>2</sub> in  
270 males did not change after treatment (**Figure 3A, 3B**). However, this parameter  
271 significantly decreased in the WAT<sub>r</sub> of females 45 days following ovariectomy. After  
272 treatment with mate extract, these levels returned to values found in control rats  
273 (**Figure 3D, 3E**).

274 The incorporation of glucose into total lipids presented the same response pattern to  
275 treatment. Males did not seem to respond (**Figure 3B**) while, in females, the extract  
276 promoted an increase in these values as compared to the OV group (**Figure 3E**).

277 No difference in basal lipolysis was observed in control or treated males and females  
278 (**Figure 3C, 3F**). In the presence of epinephrine, this response remained the same in  
279 all treated groups (**Figure 3C, 3F**).

#### 280 3.6. Gonadal adipose tissue metabolism

---

281 **Figure 4** shows WATg metabolism. The incorporation of glucose into CO<sub>2</sub> in WATg  
282 was not altered either in males or females after treatment. Also, lipid synthesis did not  
283 change in control animals. Nevertheless, the extract increased this parameter in WATg  
284 of ovariectomised rats. Also, no difference in basal lipolysis or epinephrine  
285 responsiveness was observed in control or treated males and females.

#### 286 **4. Discussion**

287 Considering the aqueous extract compounds, it is important to note that yerba mate  
288 exhibits considerable variability in the amounts of the investigated compounds related  
289 to the cultivation method, processing, and consumption, thus changing its bioactive  
290 properties.<sup>20,21</sup> The results presented here correspond to the biological effect of the  
291 aqueous extract of yerba mate containing the concentrations of methylxanthines and  
292 polyphenols as mentioned in the results section.

293 Regarding the serum parameters, the extract was able to reduce the level of  
294 triglycerides in males. These data confirm the extract's beneficial effect on the lipid  
295 profile, as previously described by other authors in rats.<sup>5,7</sup> However, in these studies  
296 the authors showed that such an improvement occurred in control males, highlighting  
297 the potential preventive benefit of this extract. To the best of our knowledge, this study  
298 represents the first time that a sex approach has been used in rats to study the effect  
299 of *Ilex paraguariensis*. However, the effect on the female group remains uncertain, and  
300 the potential use of the extract in mitigating energy unbalance in females with  
301 decreased sex hormones still needs further investigation.

302 It is important to note that the ovariectomy surgery protocol presented here did not lead  
303 to any significant changes in serum triglycerides and insulin after 45 days. Therefore,  
304 the marked changes in energy metabolism of WAT presented below appear to precede  
305 the worsening of the lipid profile. These effects on serum parameters presented here  
306 still need further study so that they can be extrapolated to humans. Postmenopausal  
307 women have a higher risk of development of cardiovascular and metabolic diseases.  
308 Many authors have reported that this is caused by the reduction in circulating  
309 oestrogens, which are known to be protective factors in several key metabolic organs,  
310 such as the liver and adipose tissue.<sup>13</sup> To the best of our knowledge, no other study  
311 has evaluated the effect of yerba mate on oestrogen-deficient females. However, it is

---

312 necessary investigate if yerba mate extract may mitigate this risk factor in  
313 postmenopausal women. In fact, a case-control study with 95 postmenopausal women  
314 revealed that consumption of mate extract is associated with a lower occurrence of  
315 coronary heart disease, dyslipidaemia and hypertension, confirming the potential use  
316 of this extract for this population.<sup>22</sup>

317 In the case of morphometric parameters, the effect of mate on weight gain has already  
318 been described by several authors in animal models of obesity in rats and humans.  
319 <sup>3,5,23</sup> Our data demonstrate that treatment did not modify weight gain and adiposity in  
320 control males. However, in ovariectomised females, we found original data suggesting  
321 a new potential use for the extract: the attenuation of weight gain in oestrogen-deficient  
322 female rats. These data should be considered further for investigation of the effect of  
323 *I. paraguariensis* on postmenopausal women, who frequently present with changes in  
324 adiposity pattern (similar to an androgen pattern) and increased weight gain.

325 The effect of *Ilex paraguariensis* on morphometric parameters has already been  
326 evaluated in humans and the results seem to agree with those observed in the  
327 ovariectomised female rats in the present study. Volunteers, men and women,  
328 received a standard dose of extract (1 g / day) for 12 weeks. After treatment, there was  
329 a significant change in body mass index (BMI), body fat mass and the percentage of  
330 body fat. Also, in the same study, the waist-hip ratio decreased in the extract group in  
331 relation to the placebo group, without showing adverse effects.<sup>3</sup> Another study, also in  
332 humans of both sexes but with higher doses of extract (50 and 100g/day) and in  
333 dyslipidaemic volunteers, showed the opposite effect, with decreased levels of  
334 triglycerides, but the maintenance of morphometric parameters.<sup>24</sup> This indicates that  
335 the investigation of the effects of *I. paraguariensis* in humans still needs further  
336 attention, to determine whether the effect is present only in conditions prior to  
337 dyslipidaemia or is maintained in patients with established lipid dysfunction.

338 Metabolism in brown adipose tissue did not change. Moreover, males and females  
339 demonstrated a response to epinephrine and the lipolysis response remained  
340 pronounced. BAT has a peculiar metabolism compared to WAT. Besides BAT's  
341 increased energy expenditure, essential for its characteristic non-shivering  
342 thermogenesis function,<sup>25</sup> it presents high lipogenesis from glucose concomitantly with  
343 a high lipolytic rate, which provides a substrate for fatty acids oxidation.<sup>26</sup> Hence, it is  
344 highly responsive to adrenergic stimulation via the  $\beta$ 3-receptor and, thus, direct



---

345 innervation of the autonomic nervous system.<sup>10</sup> BAT tissue has a buffering function,  
346 using the lipolysis products themselves and free fatty acids from the bloodstream for  
347  $\beta$ -oxidation, decreasing the circulating levels of lipids<sup>27</sup>. Another critical point to  
348 emphasise is the sexual dimorphism of this particular fat depot. Females appear to be  
349 more responsive to browning via adrenergic and sympathetic stimulation, in addition  
350 to having more mitochondria and mitochondrial cristae.<sup>10</sup> Also, women have a higher  
351 BAT mass and more energetic activity in this tissue.<sup>28</sup>

352 Our results indicate the responsiveness to epinephrine in all groups remained present  
353 in CT, ST and OVT, showing the tissue responsiveness to epinephrine did not change  
354 after treatment. The preservation of epinephrine responsiveness after treatment  
355 appears to be beneficial since the maintenance of the lipolysis/ $\beta$ -oxidation ratio in this  
356 tissue is crucial for its capability in regard to buffering lipids from the bloodstream. To  
357 the best of our knowledge, the effect of this extract on BAT has never been evaluated  
358 by other authors. Unfortunately, according to our results, there was no increase in  
359 activity in this tissue; however, the maintenance of responsiveness and the  
360 morphometric outcomes indicate that the action of extract components appears to be  
361 on the metabolism of white adipose tissue.

362 In visceral adipose tissue, OVT females demonstrated a significant change in CO<sub>2</sub>  
363 production and lipid synthesis in WAT<sub>v</sub> after 45 days. After treatment with mate extract,  
364 these parameters returned to the values found in S and ST. The oxidation of glucose  
365 to CO<sub>2</sub> and its incorporation into lipids depicted the energy activity and lipid storage  
366 capacity. In obese C57BL/6J mice, VO<sub>2</sub> and glucose tolerance, as metabolites that  
367 indicate mitochondrial metabolism and proteins involved in the respiratory chain, were  
368 decreased.<sup>29</sup> Additionally, the increase in adipocyte volume itself increases lipolysis.  
369<sup>30</sup> Thus, 45 days after ovariectomy (which led to female weight gain), glucose uptake  
370 and use from key tissues, such as muscle and adipose tissue, may have been  
371 significantly modified.<sup>31</sup>

372 Animal studies have shown that mate extract is capable of changing insulin signalling,  
373 for example, via the activation of the AKT pathway.<sup>5</sup> Therefore, the extract could  
374 restore the glucose metabolic profile, a fact never observed in females. These  
375 outcomes are initial; however, they reinforce the potential use of this extract in  
376 attenuating metabolic imbalance in postmenopausal women. In humans, the  
377 modulation of yerba mate extract still needs to be investigated. A study with male and

---

378 female non-obese volunteers indicated an increase in total body lipid oxidation with  
379 yerba mate extract consumption.<sup>4</sup> Another investigation with postmenopausal women,  
380 reported modulation of glycaemic levels after consumption of yerba mate extract.<sup>22</sup> It  
381 can hardly be said that the mechanism by which *Ilex paraguariensis* acts on serum  
382 glucose levels is only by WAT in an oestrogen-deficient state. However, the impressive  
383 modulation of oxidation and lipid synthesis from glucose in WAT contributes to a small  
384 elucidation of the broad effects of this extract, which is capable of modulating other key  
385 tissues of energy metabolism.<sup>32,33</sup>

386 Still, regarding WATv, in control animals, the effect of epinephrine as a lipolysis  
387 stimulant appeared in the WATv of males, but not females. The extract's effect in CT  
388 led to a lack of responsiveness to epinephrine, while in females the response remained  
389 the same. That is, the extract promoted a lack of response to epinephrine in males,  
390 and OV and OVT rats showed no changes.

391 As expected, male WATv presented a higher responsiveness to lipolytic stimulation  
392 when compared to females. However, the WATv of CT males was less responsive to  
393 epinephrine, which emphasises that the extract can decrease the contribution of WATv  
394 to lipolysis. In obese individuals, the contribution of WATv is more significant than  
395 subcutaneous WAT because it is more sensitive to circulating catecholamines,  
396 contributing to the increase of fatty acids in the bloodstream. This leads to a higher risk  
397 of ectopic lipid accumulation and, consequently, the development of insulin resistance.  
398 <sup>26</sup> Thus, the results indicate that the extract creates a better stock/mobilisation profile,  
399 reducing the risk of central obesity.

400 In females, WATv has a lower lipolysis rate, which characterises a protective stock  
401 pattern. Thus, the contribution of this depot to circulating lipids remains lower.<sup>26</sup> In this  
402 way, *I. paraguariensis* acts differently in males and females, improving the metabolic  
403 profile in males and maintaining the protective pattern in females.

404 In retroperitoneal adipose tissue metabolism, the incorporation of glucose into CO<sub>2</sub> and  
405 lipids in males did not change after treatment. However, these parameters significantly  
406 decreased in the WATr of females 45 days following ovariectomy. Again, after  
407 treatment with mate extract, these levels returned CO<sub>2</sub> production to values found in  
408 control rats and increased lipid synthesis.

409 Glucose uptake is significantly altered in WATr and WATv in female rats 45 days after  
410 ovariectomy in key tissues, such as the muscle and adipose tissue,<sup>31</sup> potentially

---

411 leading to the development of progressive insulin resistance. Likewise, in our study,  
412 the treatment was able to alter the oxidation and lipogenesis beneficially, indicating an  
413 improvement in glucose metabolism.

414 In WATr, no difference in basal lipolysis was observed in control or treated males and  
415 females. In the presence of epinephrine, this response remained the same in all treated  
416 groups. As already pointed out, male WAT presents higher responsiveness to lipolytic  
417 stimulation in comparison to females. However, WATr of males and females showed  
418 no responsiveness to epinephrine. The lower contribution of this depot to circulating  
419 lipids characterises a stock pattern,<sup>26</sup> and this beneficial phenotype was maintained  
420 after treatment. Additional studies should be conducted to verify the extrapolating  
421 sexual dimorphism from rodents to humans, since they present differences.<sup>12,13</sup>

422 Again, the results indicate that the extract interferes with the metabolism of white  
423 adipose tissue only through the synthesis pathways in OVT females, increasing lipid  
424 stock in adipose tissue. Cell studies show a decrease in adipocyte differentiation, lipid  
425 accumulation and inflammation. Studies with rodents have revealed that mate extract  
426 modulates adipogenic, antioxidant, inflammatory and insulin signalling.<sup>34</sup> Taken  
427 together, the outcomes reported here agree with the overall result of an improvement  
428 in WAT energy metabolism, and specifically reveal that the use of glucose by this tissue  
429 is significantly altered in relation to oxidation and lipogenesis from glucose.

430 The gonadal adipose tissue metabolism presents a high response plasticity to different  
431 treatments; however, it should be noted that this depot is quite important in rodents,  
432 but this is not necessarily true in humans.<sup>12</sup>

433 Increased lipid synthesis in the WATg of ovariectomised females initially indicated a  
434 beneficial response to treatment related to increased buffering of glucose to stock, but  
435 extrapolation to humans is not straightforward, considering its higher metabolic  
436 importance to rodents in comparison to humans.

437 We believe, the potential use of *Ilex paraguariensis* has never been explored in an  
438 animal model of ovariectomy. Even with indicating the energy imbalance benefits in  
439 postmenopausal women,<sup>22</sup> this issue needs further investigation. Nonetheless, the  
440 outcomes shown here, specifically the use of glucose substrate and lipolysis, are  
441 original, contributing to the elucidation of metabolic pathways in which this extract can  
442 beneficially modulate the adipose tissue of oestrogen-deficient females.

---

443 Regarding the mechanisms potentially involved in the outcomes presented here, it is  
444 necessary to emphasise that *Ilex paraguariensis* acts directly on adipose tissue and  
445 indirectly on key tissues in energy metabolism, such as the liver and skeletal muscle.  
446 Considering its direct action on white adipose tissue, animal model studies with high  
447 fat diet-induced obesity showed an increase in the expression of peroxisome  
448 proliferator-activated gamma receptor (PPAR $\gamma$ ) and HMG-CoA reductase genes and  
449 an increase in phosphorylated AMPK in gonadal WAT.<sup>35</sup> Another study, in the same  
450 model, showed that mate extract modulated several obesity-related genes in WAT and  
451 decreased TNF- $\alpha$ , IL-6 and leptin, in addition to restoring PPAR $\gamma$  and adiponectin  
452 expression. This same study evaluated BAT, which showed an increase in PGC-1 $\alpha$   
453 and UCP-1 after treatment.<sup>36</sup>

454 Other key tissues in energy metabolism may also contribute to improving WAT  
455 metabolism. *Ilex paraguariensis* extract was shown to attenuate hepatic metabolic  
456 imbalance in obese rats, decreasing the IKK / phosphorylated AKT ratio and NF- $\kappa$ B  
457 levels.<sup>32</sup> Also in obese mice, it led to an improved response to insulin administration  
458 and restoration of hepatic and muscular insulin substrate receptors. The authors also  
459 reported a decrease in TNF $\alpha$ , IL-6 and iNOS, but emphasised that they could not  
460 confirm whether these levels were the cause or effect of the observed weight loss.<sup>37</sup>

461 It is not possible to confidently state which of the bioactive fractions of the extract is  
462 responsible for the effects observed here. However, some studies have already  
463 evaluated the isolated action of these compounds. Polyphenols have already been  
464 shown to promote modulation of carbohydrate metabolism through their action on  
465 microbiota and absorption of secondary phenolic metabolites, but also largely via the  
466 inhibition of carbohydrate absorption by the gastrointestinal tract. Thus, this fraction  
467 may explain the attenuation of imbalances in glucose homeostasis, as well as in the  
468 prevention of these same events in healthy individuals.<sup>38</sup>

469 Studies have been also paid attention to the stimulatory properties of methylxanthines,  
470 one of bioactive fractions of the *Ilex paraguariensis* extract..<sup>39,40</sup> The specific effect of  
471 yerba mate's methylxanthine-rich fraction was also evaluated, and it was demonstrated  
472 to improve the lipid profile, reduce lipogenesis and increase lipolysis in adipose tissue,  
473 in addition to reducing abdominal adiposity in Wistar rats submitted to a high-fat diet.

474 41

---

475 Another group of compounds present in *Ilex paraguariensis* extract is the saponins,  
476 also known as matesaponins.<sup>42,43</sup> These molecules have been demonstrated to have  
477 anti-inflammatory and hypocholesterolaemic effects, in addition to improving the  
478 potential for glycaemic control.<sup>44,45</sup> However, further studies, with a focus on health  
479 applications, are needed to elucidate the action of matesaponins. One of the few  
480 studies focusing on matesaponins described that the saponin-rich fraction derived from  
481 yerba mate has important properties in regard to lipid metabolism, and is capable of  
482 increasing the faecal excretion of fat, even though there was an increase in lipogenesis  
483 in adipose tissue in rats.<sup>41</sup>

484 In fact, more studies are needed to elucidate the anti-obesity pathways through which  
485 *Ilex paraguariensis* may be acting. Still, the evaluation of these effects must be  
486 interpreted with caution, since although a particular bioactive compound can lead to  
487 such outcomes, the effects can also result from the combined effect of phenols,  
488 xanthines and saponins together.

489 The consumption of *Ilex paraguariensis* is widespread in South American countries,  
490 and the extract is already popularly known for its stimulating and anti-obesity effects.<sup>46</sup>  
491 In this regard, studies on humans have been previously performed and have shown  
492 possible beneficial effects.<sup>3,47,48</sup> However, the mechanisms and dose required for such  
493 effects to emerge have yet to be explored. Its use is feasible in obesity prevention  
494 during the menopausal period, or as a therapeutic adjunct in previously obese women.  
495 However, the specific contribution it makes towards reducing energy imbalance  
496 requires further investigation, either as a potential agent alone or combined with low  
497 doses of antidiabetic drugs.

## 498 **5. Conclusions**

499 In this study, we evaluated the potential of *Ilex paraguariensis* extract as a  
500 preventive/therapeutic agent for energy imbalance. This effect was confirmed, and rats  
501 treated with the extract presented with a beneficial response; mate was observed to  
502 promote a stock phenotype in both males and females, and modulated lipogenic  
503 pathways in females and lipolytic pathways in males. Considering the current alarming  
504 rise of lipid metabolism unbalances worldwide, and their health implications, we have  
505 contributed with original results, showing the beneficial effects of the mate extract in  
506 females after ovariectomy. In this regard, this extract shows excellent potential to be

---

507 used, not only for men, but also for women, and in particular postmenopausal women,  
508 as a beneficial modulator of WAT metabolism.

509 **Acknowledgments** : The authors would like to thank the Physiology Department of  
510 UFRGS for physical and personnel support

511 **Funding**: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento  
512 Científico e Tecnológico (CNPq).

513 **Declarations of Interest**: none.

514 **Author contributions**: All authors contributed to the study conception and design.  
515 Débora Santos Rocha coordinated all the steps of this work participating in all  
516 described activities. Maiza von Dentz and Jéssica Maschio participated in the  
517 animal's treatment and tissue collection. Jorge Felipe Argenta Model and Matheus  
518 Vieira Lima participated in the ovariectomy surgeries, animal's treatment, and tissue  
519 collection. Renata Ohlweiler and Samir Khal de Souza participated in subsequent  
520 processing of the samples destined to the lipogenesis, lipolysis, and oxidation  
521 techniques. Elaine Sarapio and Éverton Lopes Vogt participated in tissue collection  
522 and initial sample processing. Mairique Waszczuk, Simony Martiny, and Valquíria  
523 Linck Bassani evaluated the aqueous extract and performed the evaluations of  
524 polyphenols and methylxanthines. Luiz Carlos Kucharski coordinated all above-  
525 described work. All authors read and approved the final manuscript.

## 526 **References**

- 527 1. Bojić M, Simon Haas V, Šarić D, Maleš Ž. Determination of flavonoids, phenolic  
528 acids, and xanthines in mate tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.). *J Anal Methods Chem*.  
529 2013;2013. doi:10.1155/2013/658596
- 530 2. Rocha DS, Casagrande L, Model JFA, dos Santos JT, Hoefel AL, Kucharski LC.  
531 Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats.  
532 *Biomed Pharmacother*. 2018. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.132
- 533 3. Kim SY, Oh MR, Kim MG, Chae HJ, Chae SW. Anti-obesity effects of Yerba  
534 Mate (*Ilex Paraguariensis*): A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical  
535 trial. *BMC Complement Altern Med*. 2015. doi:10.1186/s12906-015-0859-1
- 536 4. Martinet A, Hostettmann K, Schutz Y. Thermogenic effects of commercially  
537 available plant preparations aimed at treating human obesity. *Phytomedicine*. 1999.  
538 doi:10.1016/S0944-7113(99)80014-2
- 539 5. de Meneses Fujii TM, Jacob PS, Yamada M, et al. Yerba Mate (*Ilex*

- 
- 540 paraguariensis) modulates NF-kappaB pathway and AKT expression in the liver of rats  
541 fed on a high-fat diet. *Int J Food Sci Nutr.* 2014;65(8):967-976.  
542 doi:10.3109/09637486.2014.945153
- 543 6. Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, et al. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*)  
544 attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in  
545 rats. *J Nutr Biochem.* 2013;24(5):809-818. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.04.016
- 546 7. Choi M-S, Park HJ, Kim SR, Kim DY, Jung UJ. Long-Term Dietary  
547 Supplementation with Yerba Mate Ameliorates Diet-Induced Obesity and Metabolic  
548 Disorders in Mice by Regulating Energy Expenditure and Lipid Metabolism. *J Med*  
549 *Food.* 2017. doi:10.1089/jmf.2017.3995
- 550 8. Tariq H, Nayudu S, Akella S, Glandt M, Chilimuri S. Non-Alcoholic Fatty  
551 Pancreatic Disease: A Review of Literature. *Gastroenterol Res.* 2016.  
552 doi:10.14740/gr731w
- 553 9. Zucker I, Beery AK. Males still dominate animal studies. *Nature.* 2010.  
554 doi:10.1038/465690a
- 555 10. Valencak TG, Osterrieder A, Schulz TJ. Sex matters: The effects of biological  
556 sex on adipose tissue biology and energy metabolism. *Redox Biol.* 2017;12:806-813.  
557 doi:10.1016/j.redox.2017.04.012
- 558 11. Iqbal F, Durham WJ, Melhem A, et al. Sex-dependent difference in the  
559 relationship between adipose-tissue cholesterol efflux and estradiol concentrations in  
560 young healthy humans. *Int J Dev Neurosci.* 2018;64:59-62.  
561 doi:10.1016/j.ijdevneu.2017.07.001
- 562 12. Karastergiou K, Fried SK. Cellular mechanisms driving sex differences in  
563 adipose tissue biology and body shape in humans and mouse models. In: *Advances*  
564 *in Experimental Medicine and Biology.* ; 2017. doi:10.1007/978-3-319-70178-3\_3
- 565 13. Newell-Fugate AE. The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte  
566 function. *Reproduction.* 2017. doi:10.1530/rep-16-0417
- 567 14. Council NR. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition.*  
568 Washington, DC: The National Academies Press; 2011. doi:10.17226/12910
- 569 15. Gnoatto SCB, Bassani VL, Coelho GC, Schenkel EP. Influência do método de  
570 extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.,  
571 Aquifoliaceae). *Quim Nova.* 2007. doi:10.1590/S0100-40422007000200012
- 572 16. Alexandra de Andrade C, Klocker Costa C, Bora K, Dallarmi Miguel M, Gomes

- 
- 573 Miguel O, Alberto Kerber V. Determination of the phenolic content and evaluation of  
574 the antioxidant activity of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-  
575 mimosoideae. *Rev Bras Farmacogn Brazilian J Pharmacogn Abr.* 2007.  
576 doi:10.1590/S0102-695X2007000200017
- 577 17. Torres IL, Gamaro GD, Silveira-Cucco SN, et al. Effect of acute and repeated  
578 restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices.  
579 *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui médicas e biológicas / Soc Bras Biofísica*  
580 *. [et al].* 2001;34(1):111-116. doi:10.1590/S0100-879X2001000100013
- 581 18. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A Simple Method for the Isolation and  
582 Purification of Total Lipides From Animal Tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.  
583 doi:10.1007/s10858-011-9570-9
- 584 19. dos Santos MP, de França SA, dos Santos JTF, et al. A Low-Protein, High-  
585 Carbohydrate Diet Increases Fatty Acid Uptake and Reduces Norepinephrine-Induced  
586 Lipolysis in Rat Retroperitoneal White Adipose Tissue. *Lipids.* 2012;47(3):279-289.  
587 doi:10.1007/s11745-011-3648-8
- 588 20. Heck CI, Schmalko M, De Mejia EG. Effect of growing and drying conditions on  
589 the phenolic composition of Mate teas (*Ilex paraguariensis*). *J Agric Food Chem.* 2008.  
590 doi:10.1021/jf801748s
- 591 21. Dartora N, De Souza LM, Santana-Filho AP, et al. UPLC-PDA-MS evaluation of  
592 bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth  
593 conditions, treatments and ageing. *Food Chem.* 2011.  
594 doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.112
- 595 22. Da Veiga DTA, Bringhenti R, Copes R, et al. Protective effect of yerba mate  
596 intake on the cardiovascular system: A post hoc analysis study in postmenopausal  
597 women. *Brazilian J Med Biol Res.* 2018. doi:10.1590/1414-431X20187253
- 598 23. Lima NDS, De Oliveira E, Da Silva APS, Maia LDA, De Moura EG, Lisboa PC.  
599 Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and  
600 inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. *Life Sci.* 2014.  
601 doi:10.1016/j.lfs.2014.09.003
- 602 24. Messina D, Soto C, Méndez A, et al. Lipid-lowering effect of mate tea intake in  
603 dyslipidemic subjects. *Nutr Hosp.* 2015. doi:10.3305/nh.2015.31.5.8386
- 604 25. González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, et al. Obesity. *Nat Rev*  
605 *Dis Prim.* 2017;3:17034. doi:10.1038/nrdp.2017.34



- 
- 606 26. van Dam AD, Boon MR, Berbée JFP, Rensen PCN, van Harmelen V. Targeting  
607 white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. *Eur J*  
608 *Pharmacol.* 2017. doi:10.1016/j.ejphar.2017.03.051
- 609 27. Hoeke G, Kooijman S, Boon MR, Rensen PCN, Berbeé JFP. Role of Brown Fat  
610 in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016.  
611 doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306647
- 612 28. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown  
613 adipose tissue in adult humans. *Obstet Gynecol Surv.* 2009.  
614 doi:10.1097/OGX.0b013e3181ac8aa2
- 615 29. Cummins TD, Holden CR, Sansbury BE, et al. Metabolic remodeling of white  
616 adipose tissue in obesity. *Am J Physiol Metab.* 2014. doi:10.1152/ajpendo.00271.2013
- 617 30. Goodpaster BH, Sparks LM. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell*  
618 *Metab.* 2017. doi:10.1016/j.cmet.2017.04.015
- 619 31. Park Y-M, Rector RS, Thyfault JP, et al. Effects of ovariectomy and intrinsic  
620 aerobic capacity on tissue-specific insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*  
621 2016;310(3):E190-9. doi:10.1152/ajpendo.00434.2015
- 622 32. De Meneses Fujii TM, Jacob PS, Yamada M, et al. Yerba mate (*Ilex*  
623 *paraguariensis*) modulates NF-kappaB pathway and AKT expression in the liver of rats  
624 fed on a high-fat diet. *Int J Food Sci Nutr.* 2014. doi:10.3109/09637486.2014.945153
- 625 33. Panza VP, Diefenthaler F, Tamborindeguy AC, et al. Effects of mate tea  
626 consumption on muscle strength and oxidative stress markers after eccentric exercise.  
627 *Br J Nutr.* 2016;115(8):1370-1378. doi:10.1017/S000711451600043X
- 628 34. Gambero A, Ribeiro ML. The positive effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*)  
629 in obesity. *Nutrients.* 2015;7(2):730-750. doi:10.3390/nu7020730
- 630 35. Pang J, Choi Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced  
631 by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Arch Biochem*  
632 *Biophys.* 2008;476(2):178-185. doi:10.1016/j.abb.2008.02.019
- 633 36. Arçari DP, Bartchewsky W, Dos Santos TW, et al. Antiobesity effects of yerba  
634 maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity.* 2009.  
635 doi:10.1038/oby.2009.158
- 636 37. Arcari DP, Bartchewsky Jr. W, dos Santos TW, et al. Anti-inflammatory effects  
637 of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with  
638 high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;335(2):110-115.

---

639 doi:10.1016/j.mce.2011.01.003

640 38. Gan RY, Zhang D, Wang M, Corke H. Health Benefits of Bioactive Compounds  
641 from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. *Nutrients*. 2018.  
642 doi:10.3390/nu10111682

643 39. Spriet LL. Caffeine and performance. *Int J Sport Nutr*. 1995;5 Suppl:S84-99.  
644 doi:10.1123/ijsn.5.s1.s84

645 40. Davis JM, Zhao Z, Stock HS, Mehl KA, Buggy J, Hand GA. Central nervous  
646 system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Regul Integr Comp*  
647 *Physiol*. 2003;284(2):R399-404. doi:10.1152/ajpregu.00386.2002

648 41. de Resende PE, Kaiser S, Pittol V, et al. Influence of crude extract and bioactive  
649 fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid  
650 metabolism. *J Funct Foods*. 2015;15:440-451. doi:10.1016/j.jff.2015.03.040

651 42. Murakami ANN, Amboni RDDMC, Prudêncio ES, et al. Concentration of  
652 biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by  
653 nanofiltration. *Food Chem*. 2013;141(1):60-65. doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.119

654 43. Martinet A, Ndjoko K, Terreaux C, Marston A, Hostettmann K, Schutz Y. NMR  
655 and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*.  
656 *Phytochem Anal*. 2001;12(1):48-52. doi:10.1002/1099-1565(200101/02)12:1<48::AID-  
657 PCA560>3.0.CO;2-#

658 44. Heck CI, De Mejia EG. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive  
659 review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci*.  
660 2007. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x

661 45. Lu JM, Wang YF, Yan HL, Lin P, Gu W, Yu J. Antidiabetic effect of total saponins  
662 from *Polygonatum kingianum* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J*  
663 *Ethnopharmacol*. 2016. doi:10.1016/j.jep.2015.12.057

664 46. Dickel ML, Rates SMK, Ritter MR. Plants popularly used for losing weight  
665 purposes in Porto Alegre, South Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007;109(1):60-71.  
666 doi:10.1016/j.jep.2006.07.003

667 47. Andersen T, Fogh J. Weight loss and delayed gastric emptying following a  
668 South American herbal preparation in overweight patients. *J Hum Nutr Diet*.  
669 2001;14(3):243-250. doi:10.1046/j.1365-277X.2001.00290.x

670 48. Yamada Y, Nakazato Y, Ohga A. The mode of action of caffeine on  
671 catecholamine release from perfused adrenal glands of cat. *Br J Pharmacol*.

---

672 1989;98(2):351-356. doi:10.1111/j.1476-5381.1989.tb12603.x

673 **Table 1. Morphometric and serum parameters of males, females and ovariectomised females after *Ilex paraguariensis* extract**  
 674 **treatment**

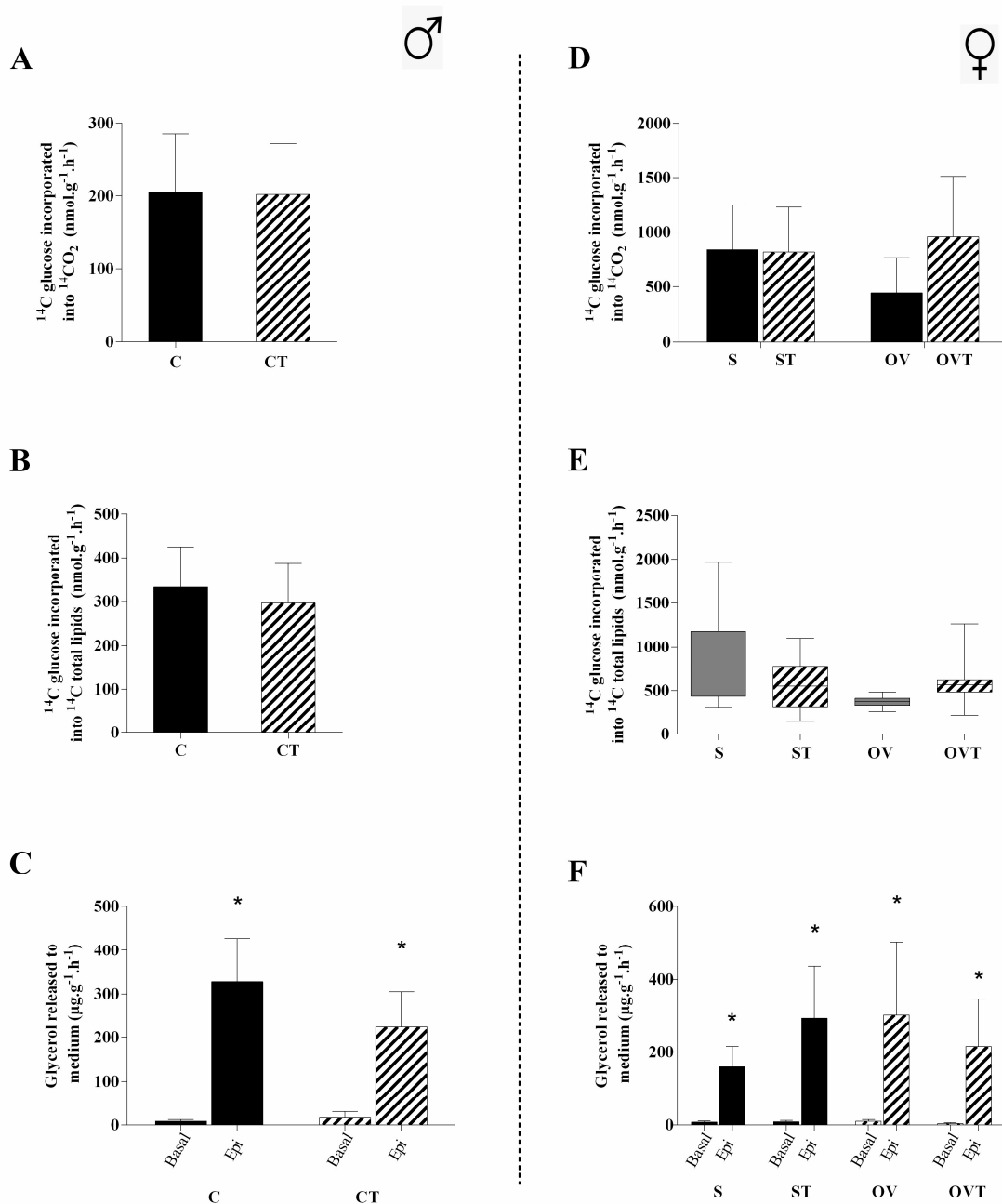
Parameter	Experimental group								ANOVA/K-W test	Post hoc
	Male			Female						
	C	CT	T/M-W test	S	ST	OV	OVT			
<b>Uterus weight (g)</b>	—	—	—	0.446 ± 0.050 <sup>a</sup>	0.513 ± 0.147 <sup>a</sup>	0.116 ± 0.029 <sup>b</sup>	0.109 ± 0.020 <sup>b</sup>	Ovariectomy	<i>P</i> < 0.0001	
<b>Weight gain (g)</b>	42.40 ± 12.03	50.45 ± 10.04	ns	26.30 ± 7.646 <sup>a</sup>	28.00 ± 5.692 <sup>a</sup>	41.67 ± 12.31 <sup>b</sup>	33.90 ± 7.795 <sup>ab</sup>	Ovariectomy	<i>P</i> = 0.0097	
<b>BAT index (10<sup>5</sup>)</b>	94.16 ± 4.699	85.57 ± 4.362	ns	137.7 (121.5/148.2) <sup>a</sup>	119.1 (108.4/133.7) <sup>ab</sup>	122.3 (105/143.6) <sup>ab</sup>	98.79 (86.57/98.79) <sup>b</sup>	—	<i>P</i> = 0.0045	
<b>WATv index (10<sup>4</sup>)</b>	64.91 (48.53/76.56)	50.74 (41.17/60)	ns	59.89 ± 5.609	48.47 ± 6.406	65.73 ± 20.24	50.21 ± 17.43	Treatment = 0.0083	ns	
<b>WATr index (10<sup>4</sup>)</b>	119.6 ± 34.82	121.4 ± 42.89	ns	68.24 (57.4/76.85)	53.99 (50.64/66.13)	127.4 (85.66/160.2)	78.73 (64.8/84.89)	ns	ns	
<b>WATg index (10<sup>4</sup>)</b>	105.6 ± 30.07	113.1 ± 31.28	ns	206.2 ± 53.79 <sup>a</sup>	136.0 ± 24.29 <sup>b</sup>	152.3 ± 58.84 <sup>ab</sup>	127.7 ± 42.58 <sup>b</sup>	Treatment	<i>P</i> = 0.0045	
<b>Glucose (mg/dL)</b>	93.65 ± 14.03	87.80 ± 18.10	ns	97.224 ± 12.07	104.04 ± 23.07	111.17 ± 13.37	109.72 ± 16.75	ns	ns	
<b>Triglycerides (mg/dL)</b>	134.2 ± 50.82	82.98 ± 42.02*	<i>P</i> = 0.028	86.214 ± 29.74 <sup>a</sup>	80.92 ± 34.07 <sup>a</sup>	64.19 ± 26.64 <sup>ab</sup>	44.44 ± 17.36 <sup>b</sup>	Ovariectomy	<i>P</i> = 0.0031	
<b>Cholesterol (mg/dL)</b>	69.65 ± 17.51	61.58 ± 16.34	ns	77.99 ± 25.87	58.04 ± 16.45	71.54 ± 19.25	66.24 ± 18.18	ns	ns	
<b>Insulin (µUI/mL)</b>	2.66 (2.04/5.03)	2.88 (1.87/3.06)	ns	5.19 ± 1.84	3.49 ± 0.75	6.21 ± 3.52	5.2 ± 2.85	ns	ns	

675 Data expressed as mean ± standard deviation or median and 25/75 percentile. Data distribution was evaluated and submitted to T test or Mann-  
 676 Whitney test for male. For females, two-way ANOVA followed by Tukey post hoc test or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc. 8-10  
 677 individuals per group and 3 individuals per group for male's insulin levels. (\*) indicate difference between groups in males. Different letters indicate  
 678 statistical difference between groups in females. BAT: brown adipose tissue and WATv : visceral, WATr: retroperitoneal and WATg: gonadal white

---

679 adipose tissue. Different letters indicate statistical difference between groups in females. BAT: brown adipose tissue and WATv : visceral, WATr:  
680 retroperitoneal and WATg: gonadal white adipose tissue

**Figure 1**

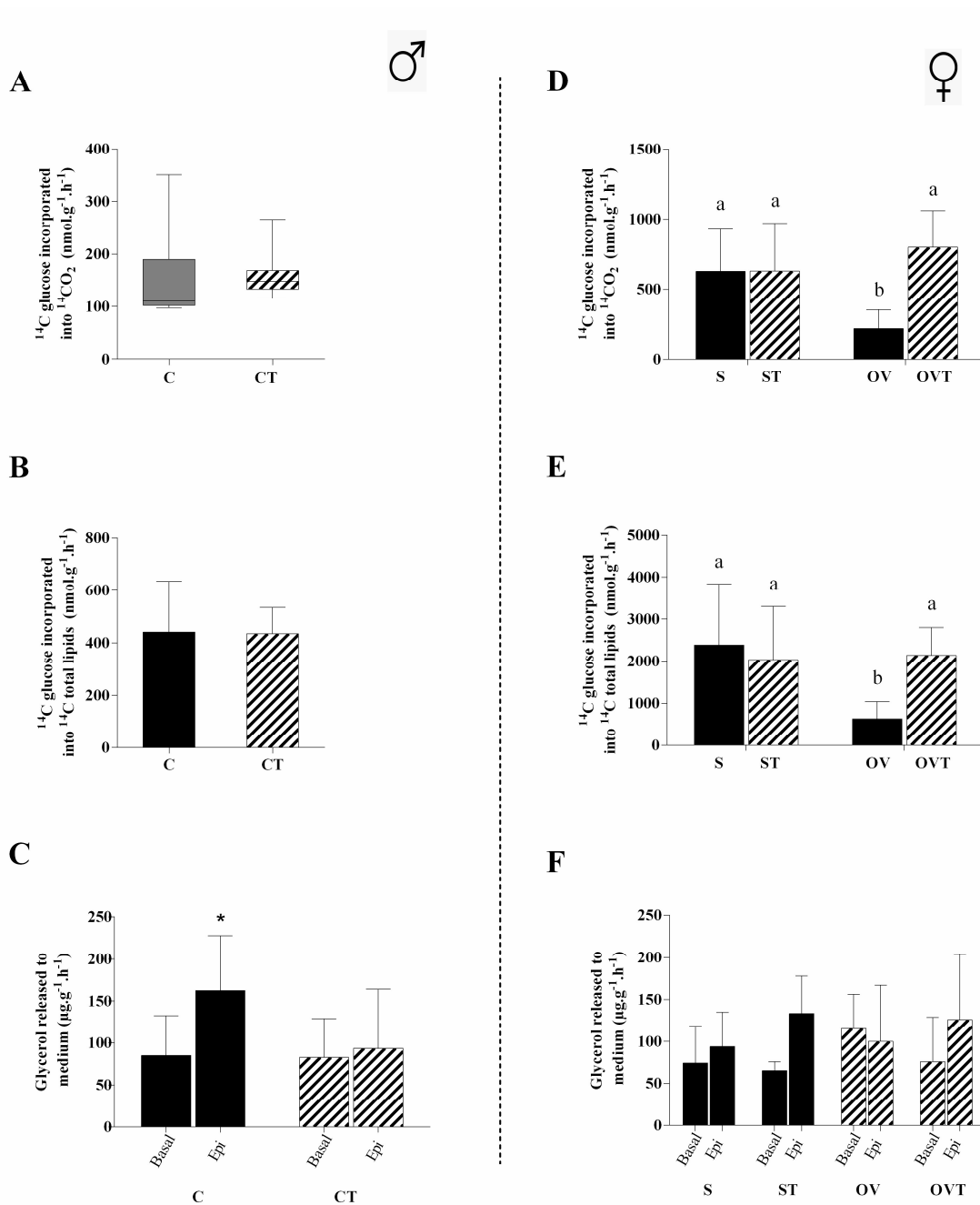


**Figure 1.** Brown adipose tissue metabolism in males, females, and ovariectomised females submitted to treatment with *Ilex paraguariensis* extract. The metabolism was observed as  $\text{CO}_2$  (A) and total lipid (B) production from labelled  $^{14}\text{C}$  glucose, and adrenergic responsiveness lipolysis (C) assays. Charts D, E and F present the results of the same assays in females. Data are expressed as the mean and respective standard deviation (SD) or the median and 25/75 percentile. Different letters indicate

---

significant differences; (\*) indicates a difference from the respective basal group in lipolysis and (#) indicates difference of basal lipolysis related to other groups. Epi: epinephrine. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.  $n=8-10$  in each experimental group. C: male control; CT: male treatment; S: female sham; ST: female sham treatment; OV: ovariectomy; OVT: ovariectomy treatment

Figure 2



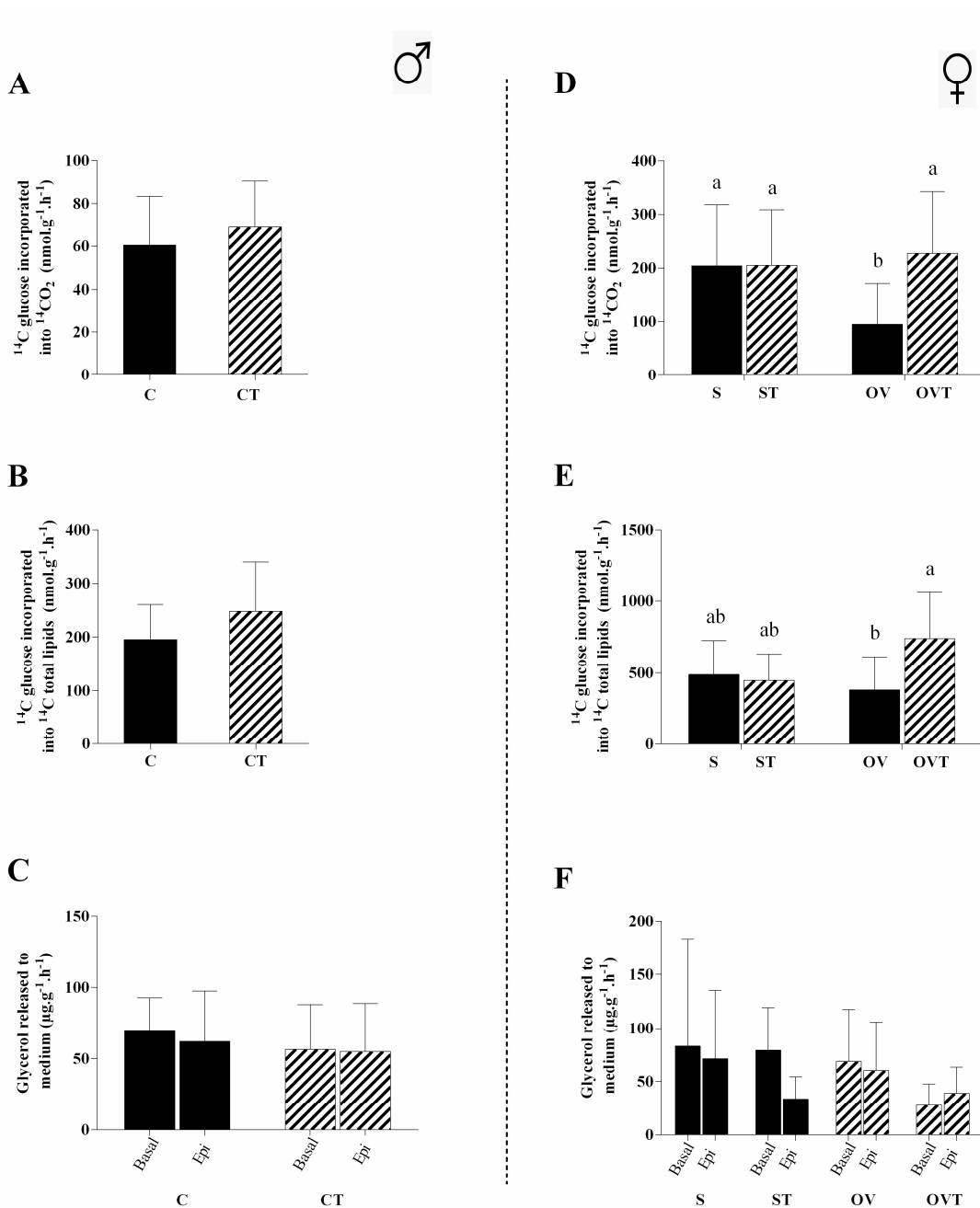
**Figure 2.** Visceral adipose tissue metabolism in males, females, and ovariectomised females submitted to treatment with *Ilex paraguariensis* extract. The metabolism was observed as  $\text{CO}_2$  (A) and total lipid (B) production from labelled  $^{14}\text{C}$  glucose, and adrenergic responsiveness lipolysis (C) assays. Charts D, E and F present the results of the same assays in females. Data are expressed as the mean and respective standard deviation (SD) or the median and 25/75 percentile. Different letters indicate



---

significant differences; (\*) indicates a difference from the respective basal group in lipolysis and (#) indicates difference of basal lipolysis related to other groups. Epi: epinephrine. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.  $n=8-10$  in each experimental group. C: male control; CT: male treatment; S: female sham; ST: female sham treatment; OV: ovariectomy; OVT: ovariectomy treatment

Figure 3

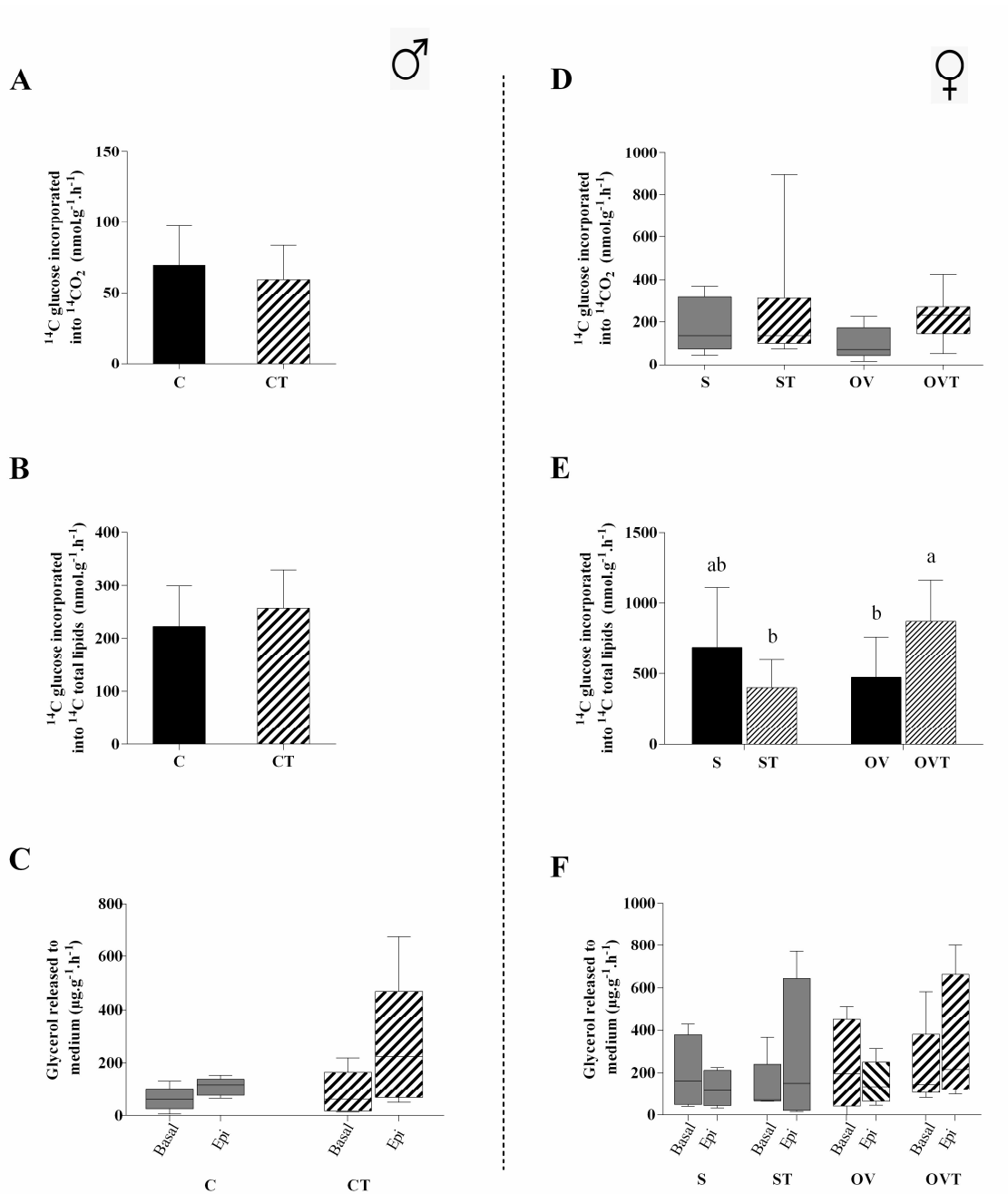


**Figure 3.** Retroperitoneal adipose tissue metabolism in males, females, and ovariectomised females submitted to treatment with *Ilex paraguariensis* extract. The metabolism was observed as  $\text{CO}_2$  (A) and total lipid (B) production from labelled  $^{14}\text{C}$  glucose, and adrenergic responsiveness lipolysis (C) assays. Charts D, E and F present the results of the same assays in females. Data are expressed as the mean and respective standard deviation (SD) or the median and 25/75 percentile. Different letters indicate significant differences; (\*) indicates a difference from the respective

---

basal group in lipolysis and (#) indicates difference of basal lipolysis related to other groups. Epi: epinephrine. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.  $n=8-10$  in each experimental group. C: male control; CT: male treatment; S: female sham; ST: female sham treatment; OV: ovariectomy; OVT: ovariectomy treatment

**Figure 4**



**Figure 4.** Gonadal adipose tissue metabolism in males, females, and ovariectomised females submitted to treatment with *Ilex paraguariensis* extract. The metabolism was observed as  $\text{CO}_2$  (A) and total lipid (B) production from labelled  $^{14}\text{C}$  glucose, and adrenergic responsiveness lipolysis (C) assays. Charts D, E and F present the results of the same assays in females. Data are expressed as the mean and respective standard deviation (SD) or the median and 25/75 percentile. Different letters indicate significant differences; (\*) indicates a difference from the respective basal group in

---

lipolysis and (#) indicates difference of basal lipolysis related to other groups. Epi: epinephrine. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.  $n=8-10$  in each experimental group. C: male control; CT: male treatment; S: female sham; ST: female sham treatment; OV: ovariectomy; OVT: ovariectomy treatment

---

## **5.2. Segundo artigo**

**Título: *Ilex paraguariensis* effects on liver and muscle metabolism in diabetic female Wistar rats**

**Periódico: Food Research International (ISSN: 0963-9969)**

**Status: Em revisão**

1 ***Ilex paraguariensis* effects on liver and muscle metabolism in diabetic female**  
2 **Wistar rats**

3 Authors: Débora Santos Rocha<sup>1\*</sup>, Maiza Von Dentz<sup>1</sup>, Jorge Felipe Argenta Model<sup>1</sup>,  
4 Samir Khal de Souza<sup>1</sup>, Renata Ohlweiler<sup>1</sup>, Vitória Girelli<sup>1</sup>, Éverton Lopes Vogt<sup>1</sup>, Mairique  
5 Waszczuk<sup>2</sup>, Simony Martiny<sup>2</sup>, Valquíria Linck Bassani<sup>2</sup>, Luiz Carlos Kucharski<sup>1</sup>

6 <sup>1</sup> Physiology Department. Federal University of Rio Grande do Sul - Sarmiento Leite, 500  
7 - 90050-170- Porto Alegre - Rio Grande do Sul- Brazil. Phone number: +55 51 33083623

8 <sup>2</sup> Faculty of Pharmacy. Federal University of Rio Grande do Sul – Av. Ipiranga, 2752 -  
9 90610-000- Porto Alegre - Rio Grande do Sul- Brazil.

10 **\*Corresponding author: Débora Santos Rocha (Master's degree).**

11 **Sarmiento Leite, 500 - 90050-170- Porto Alegre - Rio Grande do Sul- Brazil.**

12 **Phone/fax number: +55 51 33083623**

13 **debora.rocha@ufrgs.br**

14 Authors emails: debora.rocha@ufrgs.br; jorgefamodel@gmail.com;  
15 maizavondentz@hotmail.com; samirkhal.souza@gmail.com;  
16 renataohlweiler@gmail.com; vvitoriagirelli@gmail.com; evvogt@gmail.com;  
17 mairiquewaszczuk@gmail.com; simony.martiny@gmail.com; valquiria.bassani@ufrgs.br;  
18 kuchars@ufrgs.br

19

## Abstract

20 *Ilex paraguariensis* has phytochemical properties which could be useful to treat metabolic  
21 diseases such as type 1 diabetes mellitus (T1D). Gender differences in T1D have already  
22 been described and have been hidden until recently due to erroneous generalizations  
23 obtained in studies only in males. The aim of this study was to elucidate the effect of *I.*  
24 *paraguariensis* extract on female diabetic rats, focusing on carbon flux in liver and muscle.  
25 Female Wistar rats received a single dose of streptozotocin (STZ) (65 mg/kg,) or vehicle  
26 (control) intraperitoneal injection. Two days after the injections, the animals were divided  
27 in four experimental groups; control, control treated with extract, diabetic and diabetic  
28 treated with extract. After 30 days, the animals were euthanized to collect tissue and blood  
29 samples. Serum metabolites, the endocrine profile, muscle and liver metabolism were  
30 investigated. Females presented sustained glycerol release, possibly from a delay in  
31 depletion of muscle protein reserves, indicating an advantageous feature. Extract was  
32 able to improve insulin levels in control and diabetic rats and decrease lipogenesis in  
33 control and diabetic. In T1D treated with extract, liver gluconeogenesis returned to basal  
34 levels. To our knowledge, the present study was the first to evaluate effect of *I.*  
35 *paraguariensis* on female diabetic rats, which seem to present distinct phenotypes  
36 compared to males submitted to the same T1D-induction protocol. Data presented show  
37 *I. paraguariensis* was able to modulate key pathways involved in hepatic metabolism,  
38 especially gluconeogenesis and lipogenesis.

39 **Keywords:** *Ilex paraguariensis*; Diabetes; Female; Metabolism; Liver; Muscle



---

## 40 1. Introduction

41 The presence of phytochemicals in various forms of *Ilex paraguariensis* preparations is  
42 encouraging several research groups to study this plant potential as an antioxidant, anti-  
43 inflammatory and anti-obesity agent (Colpo et al., 2017; Gonzalez, Ferreira, Vazquez,  
44 Moyna, & Paz, 1993; Gugliucci & Stahl, 1995; Luz et al., 2016). *Ilex paraguariensis* is also  
45 known as yerba mate and, besides several minerals, many bioactive compounds, such  
46 as polyphenols, xanthines and saponins are present in this plant. *I. paraguariensis*  
47 polyphenols and caffeoyl derivatives have antioxidant potential comparable to green tea  
48 (Gao, Liu, Wan, Qu, & Chen, 2013; Menini, Heck, Schulze, De Mejia, & Gugliucci, 2007;  
49 Pamplona Mosimann, Wilhelm-Filho, & Da Silva, 2006). Xanthines, mainly represented  
50 by caffeine and theobromine, have stimulant effects on nervous system and anti-obesity  
51 properties (Bojić, Simon Haas, Šarić, & Maleš, 2013; Gambero & Ribeiro, 2015; Gao et  
52 al., 2013; Pang, Choi, & Park, 2008; Strassmann et al., 2008). Saponins have anti-  
53 inflammatory and hypocholesterolemic therapeutic potential (Heck & De Mejia, 2007).  
54 Since *I. paraguariensis* is considered as a metabolic improvement agent, it is reasonable  
55 to propose the investigation of its possible use in the prevention or treatment of energy  
56 imbalance states, such as type 1 diabetes mellitus (T1D).

57 Type 1 diabetes mellitus is a metabolic disorder that results from defects in insulin secretion by  
58 pancreatic  $\beta$  cells. This condition promotes cellular energy imbalance and culminates in  
59 impairment of physiological functions. Even with advances in T1D treatment, such as insulin  
60 pumps and portable glucose monitors, there is still no known cure or adequate means to prevent  
61 this disease (Atkinson, Eisenbarth, & Michels, 2014; Briet et al., 2018; Renard, 2018). In addition,  
62 combined therapies with metformin and sodium glucose transporters (SGLT 1 and 2) inhibitors  
63 have provided better control of T1D-associated pathologies, but have several side effects (Nally,  
64 Sherr, Van Name, Patel, & Tamborlane, 2019). Global incidence of T1D is estimated to double  
65 by the next decade, something that genetic factors alone cannot explain (Patterson, Dahlquist,  
66 Gyürüs, Green, & Soltész, 2009; Podar et al., 2000; Soltész, Patterson, & Dahlquist, 2007).

67 A feature not always remembered, especially in animal studies, is the gender dimorphism in  
68 metabolism. The need for this type of investigation has become increasingly clear, as many  
69 groups have observed differences between males and females in the development of metabolic  
70 pathologies and responses to treatments (Goyal et al., 2016; Picozzi & DeLuca, 2019). The

---

71 protective role of estradiol in pancreatic signaling is a prime example of gender differences in  
72 these diseases. In normal rats, the area occupied by  $\beta$  cells within pancreatic islets of female is  
73 40% larger and has 22% more  $\beta$  cells than males. In T1D rodent model, males are more  
74 susceptible to the classic protocol with streptozotocin (STZ), which promotes disease  
75 development and higher degree of damage and associated complications than in females (Bell,  
76 Khurana, Ryan, & Finegood, 1994; Cortright, Chandler, Lemon, & Dicarlo, 1997; Deeds et al.,  
77 2011; Goyal et al., 2016). In females, STZ-induced diabetes usually leads to higher or  
78 unchanged insulinemia and attenuated hyperglycemia (Chaudhari, Kim, & Yun, 2015;  
79 Thaeomor et al., 2017).

80 Therefore, a sex-based approach is necessary and may reveal distinct development  
81 mechanisms and different responses to therapeutic candidates for T1D. Thus, considering the  
82 high prevalence of diabetes, the therapeutic potential of *I. paraguariensis*, and the evidence of  
83 sexual dimorphism in diabetic state, the aim of this study was to elucidate *I. paraguariensis*  
84 extract effects on female diabetic rats. This approach aimed to explain whether there is a sex-  
85 dependent response to *I. paraguariensis* extracts in diabetes.

## 86 **2. Material and Methods**

### 87 **2.1. Animals and experimental design**

88 Female Wistar rats (8 weeks old) received a single streptozotocin (STZ) (65 mg/kg, in 0.1  
89 M citrate Buffer, pH 4.5) or vehicle (control) intraperitoneal injection. After 48h,  
90 hyperglycemia (above 250 mg/dL) was confirmed in diabetic individuals and they were  
91 sub-divided in four groups: control water (C), control treated with *I. paraguariensis* extract  
92 (CT), diabetic water (D) and diabetic treated with *I. paraguariensis* extract (DT) (ten  
93 individuals per group) for 30 days. All animal proceedings were performed by trained staff  
94 to ensure animals' welfare. At the end of the experimental treatment, the animals were  
95 weighted; the phase of the estrous cycle was verified, and then euthanized by  
96 decapitation. All animals used were in diestrous phase of the cycle. Serum, liver and  
97 skeletal muscle were collected and processed according to each protocol. Morphometric  
98 parameters were expressed as tissue index (tissue weight / body weight). All euthanasia  
99 proceedings followed the ARRIVE guidelines (Kilkenny, Browne, Cuthill, Emerson, &  
100 Altman, 2010) and were approved by Research Ethics Committee (Universidade Federal  
101 do Rio Grande do Sul Research System, protocol number: 31500).

---

102 Estrous cycle stages were determined using the following criteria of vaginal cells  
103 morphology: proestrus: predominantly nucleated epithelial cells; estrus: predominantly  
104 cornified epithelial cells; metestrus: presence of nucleated cells, but predominantly  
105 leukocytes; and diestrus: predominantly leukocyte cells.

## 106 **2.2. Plant materials and aqueous extract**

107 *Ilex paraguariensis* was obtained from commercial market (Ervateira Barão de Cotegipe,  
108 RS, Brazil/ Lot /12/17/3), mixed in water at 80 °C (70 g/L), left for 15 min, filtered, cooled  
109 and offered daily immediately after being prepared. The treatment lasted 30 days. All  
110 groups received 1 L of aqueous extract (70 g/L) for *ad libitum* consumption, and DT group  
111 received it diluted three times (23.3 g/L), because diabetic individuals tend to drink about  
112 three times more than controls when *ad libitum* consuming.

## 113 **2.3. Aqueous extract compounds measuring**

114 For quantification and characterization purposes, the same aqueous extract provided to  
115 the animals was analysed by following methods.

### 116 **2.3.1. Methylxanthines**

117 A HPLC Shimadzu Prominence 20AT module (Kyoto, Japan) coupled to a photodiode  
118 array detector (PDA) SPD-M20A, controlled by LC-Solution Multi-PDA software, was  
119 used. A Gemini RP C18 column (Phenomenex, 250 × 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size)  
120 coupled with a C18 guard column was used as stationary phase. The methylxanthines  
121 from the extract were assayed by HPLC based on previously validated method (Gnoatto,  
122 Bassani, Coelho, & Schenkel, 2007) employing caffeine and theobromine as external  
123 standards. Theobromine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and caffeine (Sigma-  
124 Aldrich) standards were properly dissolved in methanol: water 30/70 (v/v), at  
125 concentrations ranging from 0.48 to 40.0 µg/mL (caffeine) and from 0.495 to 7.005 µg/mL  
126 (theobromine). An isocratic system was employed, using methanol/water 30/70 (v/v) as  
127 mobile phase. Flow rate (1.1 mL/min) and temperature (35 ± 1 °C) were kept constant  
128 throughout the analysis, which took 10 minutes. Detection was performed at 280 nm. All  
129 samples were properly diluted with methanol/water 30/70 (v/v) seeking linearity range of  
130 standard curves. The total methylxanthine content was estimated as the sum of caffeine  
131 and theobromine individual concentrations.

---

### 132 **2.3.2. Total Phenols**

133 The total phenols from the extract were assayed by Folin-Ciocalteu method (Andrade *et*  
134 *al.*, 2007), and total phenol content was determined by colorimetric reaction of Folin-  
135 Ciocalteu reagent (yellow) to a blue complex when reductive agents are present (fenolic  
136 compounds). The reaction mixture consisted of 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent plus  
137 0.5 mL of sample. Then 0.5 mL of 10% sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) was added. The  
138 measurement was made after 30 min at room temperature. Gallic acid (Sigma-Aldrich)  
139 was used as external standard at concentrations ranging from 2.0 to 6 µg /mL, after  
140 dissolution in distilled water. The absorbance was measured in a spectrophotometer  
141 (UV-1800 Shimadzu spectrophotometer) at 760 nm wavelength. Values were expressed  
142 as gallic acid equivalents.

### 143 **2.3.3. Biochemical assays**

144 Blood was collected and centrifuged (2150 g /8 min) to obtain serum. Total cholesterol,  
145 glucose, triglycerides, and HDL-cholesterol were determined using commercial enzymatic  
146 kits (Labtest®, Minas Gerais, Brazil). Insulin, estradiol, follicle stimulating hormone (FSH),  
147 luteinizing hormone (LH), progesterone and corticosterone levels were evaluated through  
148 radioimmunoassay.

### 149 **2.3.4. Metabolic assays**

#### 150 **2.3.4.1. <sup>14</sup>C glucose incorporation into <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>**

151 <sup>14</sup>C glucose incorporation into <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was performed according to Torres *et al.* (2001).  
152 Briefly, tissues samples were sliced and incubated at 37°C for 60 min in flasks sealed with  
153 rubber caps containing 1.0 mL of KRB (Bicarbonate Krebs–Ringer buffer, pH 7.4) plus 0.1  
154 µCi [U-<sup>14</sup>C] glucose (55 mCi/mmol, Amersham, Little Chalfont, UK), and 5 mM glucose.  
155 Gaseous phase was exchanged with a 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub> mixture. Small glass wells  
156 containing strips of 3 MM-Whatman paper were placed above the level of incubation  
157 medium (<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> wells). The assay was stopped by injecting 0.25 mL of 50% trichloroacetic  
158 acid solution (v/v) through the rubber caps, and 0.25 mL of NaOH (2.0 M) solution directly  
159 into <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> wells. Flasks were maintained for 12 h at room temperature in order to capture

---

160  $^{14}\text{CO}_2$  into 3 MM-Whatman paper. The paper contents were transferred to vials containing  
161 a liquid scintillation mixture (toluene – Triton X®-100 (2:1, v/v); 2,5-diphenyloxazole (0.4%,  
162 v/v) and 2-p-phenylenebis 5-phenyloxazole (0.01%v/v), and radioactivity was measured  
163 using a liquid scintillation counter (LKB-Wallac, Perkin Elmer, WALTHAM, MA, USA).  
164 Levels of complete aerobic oxidation of glucose were expressed as  $\mu\text{mol}$  of  $^{14}\text{C}$ -glucose  
165 incorporated into  $\text{CO}_2$  per gram of tissue per hour.

#### 166 **2.3.4.2. $^{14}\text{C}$ -glucose incorporation into lipid assay**

167 Samples from  $^{14}\text{C}$ -glucose incorporation into  $^{14}\text{CO}_2$  assay were homogenized with  
168 chloroform: methanol 2:1 (v/v), followed by lipid extraction performed according to Folch,  
169 Lees, & Stanley (1957). After, saline solution (0.9% NaCl) was added and tubes were  
170 centrifuged for 10 min at 2000g. After chloroform complete evaporation, the scintillation  
171 liquid mixture was added. Samples radioactivity was assessed in a scintillation liquid  
172 counter (LKB-Wallac). Levels of lipogenesis from glucose were expressed as  $\mu\text{mol}$  of  $^{14}\text{C}$ -  
173 glucose converted to lipid per gram of tissue per hour.

#### 174 **2.3.4.3. $^{14}\text{C}$ -glucose incorporation into glycogen assay**

175 Samples from  $^{14}\text{C}$ -glucose incorporation into  $^{14}\text{CO}_2$  assay were also used to measure  
176 glycogen production. To determine glycogen content, samples were placed into 30% KOH  
177 (w/v) solution and boiled for 15 min. Ethanol (96°GL) was added to induce glycogen  
178 precipitation and samples were washed two times. Radioactivity was assessed adding  
179 scintillation liquid mixture and in a scintillation liquid counting (LKB-Wallac). Glycogenesis  
180 was  $\mu\text{mol}$   $^{14}\text{C}$ -glucose converted to glycogen per g of tissue per hour.

#### 181 **2.3.4.4. Glucose uptake**

182 Soleus muscle slices were incubated (37 °C) for 1 h in tubes containing KRB (pH 7.4) and  
183 0.1 $\mu\text{Ci}$  of 2-deoxy-D-[3H]-glucose ( $^3\text{H}$ -2-DG) (39 mCi/mmol, Amersham). After the  
184 incubation, the tissue slices were disrupted by 3 cycles of freezing/ boiling in distilled  
185 water, and then samples from incubation medium and tissue fluid were collected. Results  
186 were expressed as dpm / mL of tissue fluid per g of tissue divided by dpm/ mL of incubation  
187 medium (T/M ratio).

#### 188 **2.3.4.5. $^{14}\text{C}$ -alanine conversion into $^{14}\text{C}$ -glucose assay**

---

189 Liver slices (100±10mg) were incubated (37 °C/1 h) in tubes containing KRB (pH 7.4) and  
190 0.1 µCi of [U-<sup>14</sup>C]-alanine (151mCi/mmol; Perkin Elmer) plus 5 mM unlabeled alanine. At  
191 the end of incubation, gluconeogenic activity was determined by measuring the  
192 incorporation of <sup>14</sup>C from <sup>14</sup>C-alanine into <sup>14</sup>C-glucose in the incubation medium. Medium  
193 samples were deproteinized and <sup>14</sup>C-glucose was separated by thin-layer  
194 chromatography using n-butanol/95%; ethyl alcohol/5.4%; acetic acid in water  
195 (75:47.4:27.6, v/v/v). The spot corresponding to glucose, localized by spraying with  
196 anisaldehyde reagent (95% ethyl alcohol/concentrated sulfuric acid/p-  
197 methoxybenzaldehyde 18:1:1, v/v/v), was marked, scraped off, and dissolved in liquid  
198 scintillation mixture (toluene – Triton X®-100 (2:1, v/v); 2,5-diphenyloxazole (0.4%, v/v)  
199 and 2-p-phenylenebis 5-phenyloxazole (0.01%v/v). Radioactivity was measured using a  
200 liquid scintillation counter (LKB-Wallac, Perkin Elmer, WALTham, MA, USA). Values of  
201 gluconeogenic activity were expressed as µmol of <sup>14</sup>C-alanine converted to glucose per  
202 gram per hour.

#### 203 **2.3.4.6. Determination of tissue glycogen concentration**

204 Glycogen content was extracted according to Van Handel (1965) and determined as  
205 glucose after acid hydrolysis using a commercial kit (Labtest ®) (Geary, Langhans, &  
206 Scharrer, 1981). Results were expressed as mg of glycogen per 100 grams of tissue  
207 (mg%).

#### 208 **2.4. Statistical analyses**

209 All data expressed as means ± standard deviation (SD). Differences among groups were  
210 tested by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc test (Prism® software, 6 edition).  
211 Values of P < 0.05 were considered significant. Nonparametric data were tested by  
212 Kruskal Wallis (KW) and Dunn's post hoc, data expressed as median and 25/75  
213 interquartile range (IQR).

### 214 **3. Results**

#### 215 **3.1. Composition of *I. paraguariensis* aqueous extract**

216 *I. paraguariensis* aqueous extract used in this study contained 1.115 ± 0.029 g% caffeine  
217 (g/100 g of *I. paraguariensis*); 0.168 ± 0.005 g% theobromine and 4.661 ± 0.09 g% total  
218 phenols.

#### 219 **3.2. Hormonal profile**

---

220 The analysis of rats' vaginal smears, based on whether leukocytes were predominant  
221 within samples, was used to select diestrous females. To confirm these observations and  
222 evaluate the effect of *I. paraguariensis* extract, their endocrine profile was also determined  
223 (Table 1). The levels of FSH, LH, progesterone and corticosterone were the same among  
224 groups. Although estradiol levels varied widely among individuals, these variations were  
225 also not significant. Since plasma corticosterone levels increase in stressed animals, they  
226 were evaluated to assure that the results are from non-stressed animals. This approach  
227 ensures the optimal animal welfare and minimizes contribution of excess stress on  
228 metabolic profiles. Corticosterone median values were 176.6 (205.4/134.4) nmol/ L, which  
229 were within acceptable range and indicative of non-stressed animals. Also, after individual  
230 assessments, the highest levels of this hormone in the present study remained below  
231 those indicative of stress (Lechner et al., 2000; Pérez-Nievas, García-Bueno, Caso,  
232 Menchén, & Leza, 2007; Vázquez-Palacios, Retana-Márquez, Bonilla-Jaime, &  
233 Velázquez-Moctezuma, 2001).

### 234 **3.3. Serum metabolites**

235 After treatment for 30 days, the levels of glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL-  
236 cholesterol and glycerol in the serum and weight gain were different between diabetic and  
237 control rats (Table 2). Glucose and triglyceride levels most accurately represented profiles  
238 associated with untreated T1D; however, insulin levels did not decrease in diabetic rats.  
239 *I. paraguariensis* extract increased circulating insulin levels, in both control and diabetic  
240 rats, but did not influence the other parameters evaluated. The treatment restored the  
241 weight gain of T1D female rats to control values.

### 242 **3.4. Muscle metabolism**

243 Diabetic females showed no difference in glucose uptake (Figure 1A), glycogen synthesis  
244 (1C) and tissue glycogen (1D) when compared to controls. Glucose oxidation (1B), T1D  
245 female rats had lower than controls. *I. paraguariensis* extract did not have significant  
246 effects on any of the parameters evaluated.

### 247 **3.5. Liver metabolism**

248 In the liver, glucose oxidation (Figure 2A), glycogenesis (2B) and lipogenesis from glucose  
249 (2C) of T1D females were not significantly different from controls. However, in diabetic  
250 females, glycogen concentration (2D) and glucose synthesis from alanine (2E) were lower

---

251 than controls. In T1D rats were treated with *I. paraguariensis* extract, gluconeogenesis  
252 returned to basal levels. In addition, both control and diabetes groups had decreased  
253 lipogenesis after treatment.

#### 254 **4. Discussion**

255 Pituitary and ovarian hormone profile are typical of diestrus females, confirming the results  
256 indicated by evaluation of vaginal cell morphology (Goldman, Murr, & Cooper, 2007; Sato,  
257 Nasu, & Tsuchitani, 2016; Westwood, 2008). Hormonal fluctuations due to estrous cycle  
258 phases in rats have been well described (Goldman et al., 2007). In addition to hormonal  
259 fluctuations, metabolic variation is also inherent to different phases of cycle. In proestrus period  
260 lipogenesis increases, while in estrus and diestrus, lipolysis is increased (Hansen, Fahmy, &  
261 Nielsen, 2008). Therefore, data presented hereafter correlate exclusively with metabolism in  
262 diestrus phase, and outcomes observed here are not a consequence of metabolic changes of  
263 hormonal cycling. Moreover, the absence of differences in serum corticosterone levels,  
264 ensure that this variable has been eliminated and do not act as a confounding factor  
265 influencing energy metabolism (Jani, Telang, & Katyare, 1991; Jimeno, Hau, & Verhulst,  
266 2018).

267 The biochemical profile of STZ-induced T1D model, characterized by sustained  
268 hyperglycemia (above 250 mg/dL) and marked change in lipid profile, is already widely  
269 known and reproduced by several authors (Ward et al., 2001; Merzouk et al., 2000). These  
270 metabolic alterations were also found in this study and were consistent with changes  
271 previously shown to be associated with carbohydrate and lipid metabolism in STZ-induced  
272 T1D model. However, plasma insulin did not decrease 30 days post STZ injection, an  
273 observation inconsistent with classical literature. Some authors have previously described  
274 that the development of T1D in females has some peculiarities. In female non-obese  
275 diabetic mice (NOD), hyperglycemia is observed, but with an insulinitis index equal to  
276 control animals (Valitsky, Hoffman, Unterman, & Bar-Tana, 2017). Further, in a study  
277 evaluating diabetic male and female Wistar rats treated with Taurine, untreated diabetic  
278 females had a lesser degree of hyperglycemia compared to males and there was no  
279 statistical difference between circulating insulin levels between control and diabetic  
280 females (Thaeomor et al., 2017). Other authors have previously shown that male mice  
281 and rats are more susceptible to STZ protocol than females. Males have higher insulinitis



---

282 index and greater body weight loss and lower circulating insulin levels. These findings are  
283 indicating a diminished efficacy of T1D induction in females than in males subjected to the  
284 same treatment, which suggests females are more resistant to STZ protocol (Bell et al.,  
285 1994; Cortright et al., 1997; Deeds et al., 2011; Goyal et al., 2016). In theory, the use of  
286 different animal lineages in studies could explain these differences. However, studies with  
287 males predominate vs those using females, making it difficult to elucidate if differences  
288 are related to protocols, lineages or sex. Study conducted in our laboratory using males  
289 of same lineage and the same methodology shows that a single injection of STZ is  
290 sufficient to induce T1D and is associated with hyperglycemia and hypoinsulinemia. In  
291 fact, insulin levels in diabetic rats decreased 60% compared to control animals (Rocha et  
292 al., 2018).

293 *I. paraguariensis* extract increased circulating insulin levels. This result should be  
294 interpreted with caution, because even with statistical difference regarding treatment,  
295 there was no difference in *post hoc* test. Pretreatment with caffeine, a predominant fraction  
296 of *I. paraguariensis*, protected against STZ-induced damage in rats by preserving insulin  
297 secretion (Kagami, Morita, Onda, Hirano, & Oka, 2008). Also, the extract can modulate  
298 blood glucose and insulin levels *in vivo* in diet-induced obesity models (Choi, Park, Kim,  
299 Kim, & Jung, 2017). Taken together, it is possible suggest that the caffeine in the extract  
300 protected against islet injury, preserving insulin synthesis capacity.

301 Plasma glycerol levels were higher in diabetic than control animals. This observation  
302 indicates that the diabetic animals probably have depleted triacylglycerol stocks in  
303 adipose tissue, which is characteristic of the catabolic state expected to occur in T1D.  
304 These triacylglycerol stocks are converted to free fatty acids and glycerol, which are  
305 exported to the bloodstream. In progressive and negative-balance states, subsequent  
306 mobilization of muscle protein indicates a critical state in which all other carbohydrate and  
307 lipid stocks have already been compromised (Lucier & Weinstock, 2019). Sustained  
308 release of glycerol in diabetic females indicates an advantageous feature since it points  
309 to a delay in depletion of muscle protein reserves. This result is in accordance with muscle  
310 weight preservation observed females. Prolonged release of glycerol therefore indicates  
311 muscle maintenance and delayed energy decompensation. This data may be explained  
312 by the existence of a gender bias in lipid metabolism, which tends to positively affect

---

313 females (Valencak, Osterrieder, & Schulz, 2017). Glyceroneogenesis may be a key  
314 pathway to explain this scenario, since it restrains lipolysis, delays negative energy  
315 balance, ketogenesis, proteolysis, and other factors that follow expressive catabolism  
316 (Hanson & Reshef, 2003). Extract did not change levels of plasma glycerol in diabetic rats,  
317 which appears to be beneficial, because further change would indicate exacerbated  
318 negative energy balance.

319 Body weight gain was decreased in female T1D rats, in accordance with previously  
320 reported data in which weight gain was impaired due to predominance of catabolism  
321 resulting from chronic, untreated diabetes (Al-Achi & Greenwood, 2001). This confirms  
322 that the animals are in a predominantly catabolic state, even when insulin concentration  
323 is maintained, which can decrease the severity of T1D. Treatment with *I. paraguariensis*  
324 extract restored weight gain in T1D female rats. This result revealed that the catabolic  
325 state of this disease might have been attenuated with treatment.

326 There have been no previous studies investigating *I. paraguariensis* extract effect on  
327 female T1D rats. Further, the mechanism by which the extract mediates the modulation  
328 of T1D-associated effects in female rats has not been elucidated. In this study, the  
329 modulation biochemical profile of diabetic female rats was not altered post-treatment with  
330 the extract, as observed in males. However, the treatment restored the weight gain of T1D  
331 female rats to control values This result should be considered when extracts are used as  
332 a nutraceutical for both men and women. Therefore, the use of *I. paraguariensis* extract  
333 as a therapeutic candidate for metabolic dysfunction should be carefully evaluated for  
334 females. Several authors have already highlighted this assumption and pointed out that  
335 estradiol as may be a protective factor for the development of numerous diseases.  
336 Therefore, females in reproductive age have an endogenous mechanism protecting  
337 against metabolic dysfunction, which results in a different metabolic profile in relation to  
338 males (Barros & Gustafsson, 2011; Nadal-Casellas, Proenza, Lladó, & Gianotti, 2012).  
339 This study is another to confirm the problem of extrapolating data on possible therapeutic  
340 agents obtained from working only with males to entire populations.

341 Regarding STZ-induced diabetes model, the alteration of energetic substrates used by  
342 skeletal muscle when faced with insulin deficiency has been well described (Lucier &  
343 Weinstock, 2019). Due to the importance of this hormone as an anabolic agent in muscle

---

344 tissue, the insulin-dependent glucose uptake by GLUT-4 is impaired in individuals with  
345 T1D. Failure to translocate GLUT4 leads to impairment of glucose oxidation to CO<sub>2</sub> and  
346 glycogen storage (Lucier & Weinstock, 2019). In diabetic state, there is a substrate switch  
347 prioritizing the use of circulating fatty acids for oxidation instead of glucose, and liver  
348 dysfunction in lipid metabolism plus increased lipolysis in white adipose tissue, increases  
349 levels of circulating fatty acids.

350 Decreased muscle glucose oxidation is in accordance with development of insulin  
351 signaling dysfunction combined with hyperglycemia, which can lead to decreases in  
352 utilization of glucose for ATP synthesis. However, maintenance of glucose uptake,  
353 glycogenesis, and tissue glycogen concentration indicates that the results should be  
354 interpreted with caution, since they indicate that the studied rats had a mild dysfunction in  
355 muscular insulin signaling.

356 The majority of animal studies investigating mechanisms responsible for energetic  
357 changes occurring in diabetic state are developed male animals (Valencak et al., 2017).  
358 This may lead to discrepancies between research groups that use the same diabetes  
359 induction protocols, but study different sexes. Protocols have only been well standardized  
360 in male animals. The role of estradiol is a point to be explored, as its numerous protective  
361 hormone effects have already been described, such as increased muscle sensitivity to  
362 insulin. This increased sensitivity results from an increased GLUT4 translocation and  
363 glucose uptake in ovariectomized females treated with estradiol compared to non-treated  
364 ovariectomized animals (Barros & Gustafsson, 2011; Li et al., 2018; Tepavcevic et al.,  
365 2011). Thus, the protective action of estradiol may lead to development of milder diabetes  
366 phenotype compared to males submitted to same protocol.

367 Beneficial effects of *I. paraguariensis* extracts on muscular physiology have already been  
368 described and were associated with the presence of caffeine and methylxanthines  
369 Caffeine may act by inhibiting muscle adenosine receptors, leading to increased  
370 intracellular cAMP and consequently enhance the activation of AMPK/mTOR signaling  
371 pathway. This leads to activation of protein synthesis and inhibition of proteolysis  
372 pathways (Navegantes, Resano, Migliorini, & Kettelhut, 2000). Indirectly, methylxanthines  
373 can increase catecholamine release (Davis et al., 2003; Spriet, 1995; Yamada, Nakazato,  
374 & Ohga, 1989). Increased levels of catecholamines, in turn, act via  $\beta$ 2 adrenergic receptor,

---

375 which also result in increased levels of cAMP and, consequently, protect muscle tissue.  
376 Another indirect way that *I. paraguariensis* extract may function is through modulating lipid  
377 profiles, reducing levels of circulating fatty acids, which are known to promote muscle  
378 dysfunction in T1D pathogenesis (Gambero & Ribeiro, 2015; Gao et al., 2013).

379 However, no significant effects of *I. paraguariensis* extract were observed for any of the  
380 evaluated parameters. The explanation could be the mild STZ-induced T1D phenotype  
381 already observed in females. The maintenance of muscle weight in these animals  
382 indicates that the muscle tissue was preserved. Thus, effects of *I. paraguariensis* extract  
383 on muscle energy metabolism can be hidden by physiological maintenance, not tested in  
384 classical T1D state (Barros & Gustafsson, 2011; Nadal-Casellas et al., 2012; Puaah &  
385 Bailey, 1985; Tepavcevic et al., 2011).

386 Since insulin modulates the activity of key enzymes involved in liver energy metabolism,  
387 the detailed mechanisms of liver dysfunctions associated with T1D have been well  
388 characterized in literature. Insulin modulates key enzymes involved in energy metabolism  
389 in this tissue. This hormone is essential for substrate storage, primarily during postprandial  
390 period, which leads to increased levels of liver glycogen and lipid stores in adipose tissues.  
391 In T1D, changes related to insulin signaling lead to increased glucagon levels. As result,  
392 glucose is released from liver tissue by increase degradation of glycogen stores as well  
393 as via gluconeogenesis, which further contributes to maintaining a state characterized by  
394 hyperglycemia. Decreased levels of glucose oxidation and changes in lipid profile leads  
395 to excessive accumulation of fat within the liver (steatosis) (Buniam, Chukijrunroat,  
396 Khamphaya, Weerachayaphorn, & Saengsirisuwan, 2019; Das, Padayatti, & Paulose,  
397 1996).

398 Depletion of glycogen stores is in accordance with data previously described in literature,  
399 showing a negative balance and consequent depletion of energy stores that occurs in T1D  
400 (Hu et al., 2019; Kishore et al., 2006; Winnick et al., 2016). However, decrease in  
401 gluconeogenesis must be carefully evaluated. Data presented here describes contribution  
402 of alanine to hepatic gluconeogenesis and does not necessarily describe global  
403 gluconeogenesis. Thus, alanine assay described here is insufficient to infer that  
404 gluconeogenesis is decreased in diabetic animals in this study. Other authors previously  
405 pointed out there that there are discrepancies in literature regarding the contribution of

---

406 different substrates to glucose production in liver (Akimoto, Pedrinho, Lopes, & Bazotte,  
407 2000; Chung, Chacko, Sunehag, & Haymond, 2015). In particular, authors using animals  
408 with alloxan-induced diabetes have previously shown alanine does not contribute to  
409 gluconeogenesis in liver (Wagle, Ingebretsen, & Sampson, 1975). Moreover, authors  
410 pointed out that, in the absence of insulin effects, this pathway was modulated by  
411 concentration of several different substrates, which may be derived from different  
412 intermediates of gluconeogenic pathway. Blood glycerol, lactate and glutamine, among  
413 others, have been shown to significantly contribute to gluconeogenesis and can be used  
414 when the relative concentration of each substrate is increased (Chung et al., 2015).  
415 Therefore, it is remarkable that alanine in T1D is released mainly when the muscle is in  
416 energy balance and consequent predominance of proteolysis pathways (Karl, Garber, &  
417 Kipnis, 1976). Data presented here regarding skeletal muscle show rats with T1D rats  
418 have a negative balance in this tissue, but so it is reasonable to assume alanine has not  
419 been released from this tissue to be used as preferential substrate for gluconeogenesis  
420 in liver. Thus, decrease in contribution of alanine to glucose synthesis in T1D disease  
421 model may be explained by use of another substrate in gluconeogenic pathway.  
422 By assessing plasma glycerol levels, this another substrate use for gluconeogenesis  
423 hypothesis was reinforced. As already described, serum glycerol concentration increased  
424 in diabetic females. Considering that muscle mass was maintained in these animals, the  
425 importance of glycerol as a gluconeogenic precursor in liver, and the reduced contribution  
426 of alanine to liver gluconeogenesis observed, it is reasonable to suggest that glycerol  
427 contributes significantly more to the hepatic production of glucose than alanine in the  
428 present conditions.  
429 The observation that other indicators of energy status remained unchanged also can be  
430 compared with previous studies, but with some caution. Again, several authors have  
431 previously described that estradiol plays an important role in regulation of insulin signaling  
432 in liver tissue. The protective role of estradiol leads to increased sensitivity to insulin and  
433 results in attenuation of steatosis, decreased lipid oxidation and other parameters  
434 indicators of energy imbalance (Buniam et al., 2019; Gowri, Sengupta, Bertera, &  
435 Katzenellenbogen, 2007). Observations were consistent with a milder phenotype affecting

---

436 energy imbalance in females compared to males with T1D, which can likely be attributed  
437 to protective action of estradiol.

438 In T1D rats treated with *I. paraguariensis* extract, gluconeogenesis returned to basal  
439 levels. In addition, both control and diabetic groups had increased lipogenesis from  
440 glucose. Stimulation of gluconeogenesis by caffeine has already been described and is a  
441 contradictory point for presupposed use of *I. paraguariensis* by patients with T1D. The  
442 acute effects of caffeine, which are mediated through inhibition of adenosine receptors,  
443 increase intracellular cAMP levels and stimulate hepatic glucose production (Czenczek-  
444 Lewandowska et al., 2019; Zaharieva & Riddell, 2013). This appears contrary when  
445 antidiabetic effects are desired. However, as it has been pointed out in adolescents with  
446 treated T1D, caffeine prevents hypoglycemia during exercise, which could lead to  
447 increased adherence to exercise protocols. In long term, benefits of metabolic adaptation  
448 to training and its consequences to improving insulin signaling and decreasing need for  
449 sensitizing drugs are already known. Therefore, it is reasonable to presume that  
450 methylxanthines are potential therapeutic adjuvants in T1D (Czenczek-Lewandowska et  
451 al., 2019; Zaharieva & Riddell, 2013). Saponins within *I. paraguariensis* extracts are also  
452 good therapeutic candidates for treatment of T1D. Although not many studies have been  
453 performed evaluating biological effects of these compounds, those examining different  
454 saponin-containing extracts have shown great potential in direct stimulation of  
455 IRS1/PI3K/AKT signaling in liver (Guo et al., 2019).

456 Finally, the decrease in lipogenesis in control and diabetic female rats treated with *I.*  
457 *paraguariensis* extract seems to correspond to the classic mechanism of action  
458 associated with methylxanthines. These molecules act increasing circulating levels of  
459 catecholamines and directly modulating adenosine receptors, resulting in increased fatty  
460 acid release and enhanced lipid catabolism (Zaharieva & Riddell, 2013). Therefore, it is  
461 difficult to conclude whether the effects of *I. paraguariensis* extract on female T1D rats'  
462 liver are beneficial or not. However, several studies have mentioned extract of *I.*  
463 *paraguariensis* can contribute to restoration of imbalances in lipid profile of rats exposed  
464 to hyperlipidemic diets and healthy volunteers (Gao et al., 2013; Messina et al., 2015).  
465 Further, extracts can promote mitigation of hepatic lipid metabolism dysfunction,

---

466 diminishing the prevalence of steatosis markers and improving HDL, triglyceride, VLDL  
467 and LDL profile of treated rats (Gambero & Ribeiro, 2015; Gao et al., 2013)

468 Thus, females appear to have distinct mechanisms for diabetes development when  
469 compared to males, which may be explained by the protective action of estradiol. The  
470 effect of extracts on female rats has potential to modulate important pathways regulating  
471 energetic state of liver tissue, but few studies involving females treated with *I.*  
472 *paraguariensis* have been performed.

473 To our knowledge, the present study was the first to evaluate *I. paraguariensis* effect on  
474 diabetic female rats, which seem to present distinct phenotypes compared to males  
475 submitted to the same T1D-induction protocol. In this context, it is necessary to  
476 reinvestigate the mechanisms of induction of diabetes in experimental model rats. After  
477 which, effects of this extract in females should be reevaluated in such a way sex bias does  
478 not present itself as a factor that hinders reproducibility in human studies.

479 Data presented in this paper show that *I. paraguariensis* was able to modulate key  
480 pathways involved in hepatic metabolism, especially with respect to gluconeogenesis and  
481 lipogenesis. This indicates that the extract may be useful for treatment of chronic  
482 metabolic diseases. Further studies will be needed in order to elucidate the extract  
483 mechanisms involved in the development of these types of metabolic changes, that likely  
484 affect the way these extracts would be used as a nutraceutical candidate.

485 **Author contributions: Débora Santos Rocha:** Conceptualization, Methodology, Data  
486 curation, Writing- Original draft preparation, Writing - Review & Editing, Investigation,  
487 Formal analysis, Visualization, **Maiza Von Dentz** and **Jorge Felipe Argenta Model:**  
488 Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Review & Editing. **Renata**  
489 **Ohlweiler, Samir Khal de Souza, Vitória Girelli** and **Éverton Lopes Vogt:**  
490 Methodology, Investigation. **Mairique Waszczuk and Simony Martiny:** Methodology,  
491 Formal analysis. **Valquíria Linck Bassani:** Resources, Supervision. **Luiz Carlos**  
492 **Kucharski:** Conceptualization, Supervision, Resources, Methodology, Writing - Review  
493 & Editing, Project administration, Funding acquisition.

494 **Acknowledgments:** Authors would like to thank Physiology Department of UFRGS for  
495 physical and personal support and CNPq for funding this research.

---

496 **Conflicts of Interest:** none.

497 **Funding:** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico  
498 e Tecnológico (CNPq).



---

**References**

- 500 Akimoto, L. S., Pedrinho, S. R. F., Lopes, G., & Bazotte, R. B. (2000). Rates of  
501 gluconeogenesis in perfused liver of alloxan-diabetic fed rats. *Research Communications*  
502 *in Molecular Pathology and Pharmacology*, 107(1-2), 65–77.
- 503 Al-Achi, a, & Greenwood, R. (2001). A brief report on some physiological parameters of  
504 streptozocin-diabetic rat. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(5), 465–468.  
505 <https://doi.org/10.1081/DDC-100104322>
- 506 Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*.  
507 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- 508 Barros, R. P. A., & Gustafsson, J. Å. (2011). Estrogen receptors and the metabolic  
509 network. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.005>
- 510 Bell, R. C., Khurana, M., Ryan, E. A., & Finegood, D. T. (1994). Gender differences in the  
511 metabolic response to graded numbers of transplanted islets of Langerhans.  
512 *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo.135.6.7988458>
- 513 Bojić, M., Simon Haas, V., Šarić, D., & Maleš, Ž. (2013). Determination of flavonoids,  
514 phenolic acids, and xanthines in mate tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.). *Journal of*  
515 *Analytical Methods in Chemistry*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/658596>
- 516 Briet, C., Piffaretti, C., Fosse, S., Denis, P., Allix, I., Campagna, A. F., & Coutant, R.  
517 (2018). [Epidemiology of type 1 diabetes and its complications]. *La Revue du praticien*,  
518 68(6), 607–610.
- 519 Buniam, J., Chukijrunroat, N., Khamphaya, T., Weerachayaphorn, J., & Saengsirisuwan,  
520 V. (2019). Estrogen and voluntary exercise attenuate cardiometabolic syndrome and  
521 hepatic steatosis in ovariectomized rats fed a high-fat high-fructose diet. *American Journal*  
522 *of Physiology. Endocrinology and Metabolism*.  
523 <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00466.2018>
- 524 Chaudhari, H. N., Kim, S. W., & Yun, J. W. (2015). Gender-dimorphic regulation of DJ1  
525 and its interactions with metabolic proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal*  
526 *of Cellular and Molecular Medicine*, 19(5), 996–1009. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12490>

---

527 Choi, M.-S., Park, H. J., Kim, S. R., Kim, D. Y., & Jung, U. J. (2017). Long-Term Dietary  
528 Supplementation with Yerba Mate Ameliorates Diet-Induced Obesity and Metabolic  
529 Disorders in Mice by Regulating Energy Expenditure and Lipid Metabolism. *Journal of*  
530 *Medicinal Food*. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3995>

531 Chung, S. T., Chacko, S. K., Sunehag, A. L., & Haymond, M. W. (2015). Measurements  
532 of gluconeogenesis and glycogenolysis: A methodological review. *Diabetes*.  
533 <https://doi.org/10.2337/db15-0640>

534 Colpo, A. C., de Lima, M. E., Maya-López, M., Rosa, H., Márquez-Curiel, C., Galván-  
535 Arzate, S., ... Folmer, V. (2017). Compounds from *ilex paraguariensis* extracts have  
536 antioxidant effects in the brains of rats subjected to chronic immobilization stress. *Applied*  
537 *Physiology, Nutrition and Metabolism*. <https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0267>

538 Cortright, R. N., Chandler, M. P., Lemon, P. W. R., & Dicarlo, S. E. (1997). Daily exercise  
539 reduces fat, protein and body mass in male but not female rats. *Physiology and Behavior*.  
540 [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00148-0)

541 Czenczek-Lewandowska, E., Leszczak, J., Weres, A., Baran, J., Wyszynska, J.,  
542 Grzegorzczak, J., ... Mazur, A. (2019). Sedentary behaviors in children and adolescents  
543 with type 1 diabetes, depending on the insulin therapy used. *Medicine*, *98*(19), e15625.  
544 <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015625>

545 Das, A. V., Padayatti, P. S., & Paulose, C. S. (1996). Effect of leaf extract of *Aegle*  
546 *marmelose* (L.) Correa ex Roxb. on histological and ultrastructural changes in tissues of  
547 streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, *34*(4), 341–  
548 345.

549 Davis, J. M., Zhao, Z., Stock, H. S., Mehl, K. A., Buggy, J., & Hand, G. A. (2003). Central  
550 nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Regul Integr*  
551 *Comp Physiol*, *284*(2), R399-404. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00386.2002>

552 Deeds, M. C., Anderson, J. M., Armstrong, A. S., Gastineau, D. A., Hiddinga, H. J.,  
553 Jahangir, A., ... Kudva, Y. C. (2011). Single dose streptozotocin-induced diabetes:  
554 Considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory Animals*.

---

555 <https://doi.org/10.1258/la.2010.010090>

556 Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A Simple Method for the Isolation and  
557 Purification of Total Lipides From Animal Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1),  
558 497–509. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9570-9>

559 Gambero, A., & Ribeiro, M. L. (2015). The positive effects of yerba mate (*Ilex*  
560 *paraguariensis*) in obesity. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu7020730>

561 Gao, H., Liu, Z., Wan, W., Qu, X., & Chen, M. (2013). Aqueous extract of yerba mate tea  
562 lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. *Phytotherapy Research*,  
563 27(8), 1225–1231. <https://doi.org/10.1002/ptr.4856>

564 Geary, N., Langhans, W., & Scharrer, E. (1981). Metabolic concomitants of glucagon-  
565 induced suppression of feeding in the rat. *American Journal of Physiology - Regulatory*  
566 *Integrative and Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1981.241.5.r330>

567 Gnoatto, S. C. B., Bassani, V. L., Coelho, G. C., & Schenkel, E. P. (2007). Influência do  
568 método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-  
569 Hil., Aquifoliaceae). *Quimica Nova*. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200012>

570 Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle:  
571 Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects*  
572 *Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*.  
573 <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>

574 Gonzalez, A., Ferreira, F., Vazquez, A., Moyna, P., & Paz, E. A. (1993). Biological  
575 screening of Uruguayan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(3), 217–220.

576 Gowri, P. M., Sengupta, S., Bertera, S., & Katzenellenbogen, B. S. (2007). Lipin1  
577 regulation by estrogen in uterus and liver: Implications for diabetes and fertility.  
578 *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1728>

579 Goyal, S. N., Reddy, N. M., Patil, K. R., Nakhate, K. T., Ojha, S., Patil, C. R., & Agrawal,  
580 Y. O. (2016). Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically  
581 relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate  
582 therapeutics. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.032>

---

583 Gugliucci, A., & Stahl, A. J. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited by  
584 extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 35(1),  
585 47–56.

586 Guo, X., Sun, W., Luo, G., Wu, L., Xu, G., Hou, D., ... Liu, T. (2019). Panax notoginseng  
587 saponins alleviate skeletal muscle insulin resistance by regulating the IRS1–PI3K–AKT  
588 signaling pathway and GLUT4 expression. *FEBS Open Bio*. [https://doi.org/10.1002/2211-](https://doi.org/10.1002/2211-5463.12635)  
589 5463.12635

590 Hansen, F. M., Fahmy, N., & Nielsen, J. H. (2008). The influence of sexual hormones on  
591 lipogenesis and lipolysis in rat fat cells. *Acta Endocrinologica*.  
592 <https://doi.org/10.1530/acta.0.0950566>

593 Hanson, R. W., & Reshef, L. (2003). Glyceroneogenesis revisited. In *Biochimie*.  
594 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2003.10.022>

595 Heck, C. I., & De Mejia, E. G. (2007). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A  
596 comprehensive review on chemistry, health implications, and technological  
597 considerations. *Journal of Food Science*. [https://doi.org/10.1111/j.1750-](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x)  
598 3841.2007.00535.x

599 Hu, Z., Li, E., Sullivan, M. A., Tan, X., Deng, B., Gilbert, R. G., & Li, C. (2019). Glycogen  
600 structure in type 1 diabetic mice: Towards understanding the origin of diabetic glycogen  
601 molecular fragility. *International Journal of Biological Macromolecules*.  
602 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.186>

603 Jani, M. S., Telang, S. D., & Katyare, S. S. (1991). Effect of corticosterone treatment on  
604 energy metabolism in rat liver mitochondria. *Journal of Steroid Biochemistry and*  
605 *Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(91\)90317-X](https://doi.org/10.1016/0960-0760(91)90317-X)

606 Jimeno, B., Hau, M., & Verhulst, S. (2018). Corticosterone levels reflect variation in  
607 metabolic rate, independent of ‘stress.’ *Scientific Reports*. [https://doi.org/10.1038/s41598-](https://doi.org/10.1038/s41598-018-31258-z)  
608 018-31258-z

609 Kagami, K., Morita, H., Onda, K., Hirano, T., & Oka, K. (2008). Protective effect of caffeine  
610 on streptozotocin-induced beta-cell damage in rats. *Journal of Pharmacy and*

---

611 *Pharmacology*. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.9.0007>

612 Karl, I. E., Garber, A. J., & Kipnis, D. M. (1976). Alanine and glutamine synthesis and  
613 release from skeletal muscle. III. Dietary and hormonal regulation. *Journal of Biological*  
614 *Chemistry*.

615 Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Animal  
616 research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *British Journal of*  
617 *Pharmacology*, 160(7), 1577–1579. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>

618 Kishore, P., Gabriely, I., Cui, M. H., Di Vito, J., Gajavelli, S., Hwang, J. H., & Shamoon, H.  
619 (2006). Role of hepatic glycogen breakdown in defective counterregulation of  
620 hypoglycemia in intensively treated type 1 diabetes. *Diabetes*.  
621 <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.03.06.db05-0849>

622 Lechner, O., Dietrich, H., Oliveira Dos Santos, A., Wieggers, G. J., Schwarz, S., Harbutz,  
623 M., ... Wick, G. (2000). Altered circadian rhythms of the stress hormone and melatonin  
624 response in lupus-prone MRL/MP-fa(lpr) mice. *Journal of Autoimmunity*.  
625 <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0375>

626 Li, Y., Huang, J., Yan, Y., Liang, J., Liang, Q., Lu, Y., ... Li, H. (2018). Preventative effects  
627 of resveratrol and estradiol on streptozotocin-induced diabetes in ovariectomized mice  
628 and the related mechanisms. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204499>

629 Lucier, J., & Weinstock, R. S. (2019). *Diabetes Mellitus Type 1*. Treasure Island (FL).

630 Luz, A. B. G., Da Silva, C. H. B., Nascimento, M. V. P. S., De Campos Facchin, B. M.,  
631 Baratto, B., Fröde, T. S., ... Dalmarco, E. M. (2016). The anti-inflammatory effect of *Ilex*  
632 *paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. *International*  
633 *Immunopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.027>

634 Menini, T., Heck, C., Schulze, J., De Mejia, E., & Gugliucci, A. (2007). Protective action of  
635 *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-  
636 density lipoprotein. *Planta Medica*, 73(11), 1141–1147. [https://doi.org/10.1055/s-2007-](https://doi.org/10.1055/s-2007-981585)  
637 981585

638 Messina, D., Soto, C., Méndez, A., Corte, C., Kemnitz, M., Avena, V., ... Elizalde, R. P.

---

639 (2015). Lipid-lowering effect of mate tea intake in dyslipidemic subjects. *Nutricion*  
640 *Hospitalaria*. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.5.8386>

641 Nadal-Casellas, A., Proenza, A. M., Lladó, I., & Gianotti, M. (2012). Sex-dependent  
642 differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-  
643 induced obesity. *Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1139/o11-069>

644 Nally, L. M., Sherr, J. L., Van Name, M. A., Patel, A. D., & Tamborlane, W. V. (2019).  
645 Pharmacologic treatment options for type 1 diabetes: what's new? *Expert Review of*  
646 *Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1597705>

647 Navegantes, L. C. C., Resano, N. M. Z., Migliorini, R. H., & Kettelhut, Í. C. (2000). Role of  
648 adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat  
649 skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*.

650 Pamplona Mosimann, A. L., Wilhelm-Filho, D., & Da Silva, E. L. (2006). Aqueous extract  
651 of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed  
652 rabbits. *BioFactors*, 26(1), 59–70. <https://doi.org/10.1002/biof.5520260106>

653 Pang, J., Choi, Y., & Park, T. (2008). *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity  
654 induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of*  
655 *Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.019>

656 Patterson, C. C., Dahlquist, G. G., Gyürüs, E., Green, A., & Soltész, G. (2009). Incidence  
657 trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases  
658 2005-20: a multicentre prospective registration study. *The Lancet*.  
659 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60568-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60568-7)

660 Pérez-Nievas, B. G., García-Bueno, B., Caso, J. R., Menchén, L., & Leza, J. C. (2007).  
661 Corticosterone as a marker of susceptibility to oxidative/nitrosative cerebral damage after  
662 stress exposure in rats. *Psychoneuroendocrinology*.  
663 <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.04.011>

664 Picozzi, A., & DeLuca, F. (2019). Depression and glycemic control in adolescent diabetics:  
665 evaluating possible association between depression and hemoglobin A1c. *Public Health*.  
666 <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2019.02.005>

---

667 Podar, T., Solntsev, A., Reunanen, A., Urbonatte, B., Zalinkevicius, R., Karvonen, M., ...  
668 Tuomilehto, J. (2000). Mortality in patients with childhood-onset type 1 diabetes in Finland,  
669 Estonia, and Lithuania: Follow-up of nationwide cohorts. *Diabetes Care*.  
670 <https://doi.org/10.2337/diacare.23.3.290>

671 Puah, J. A., & Bailey, C. J. (1985). Effect of ovarian hormones on glucose metabolism in  
672 mouse soleus muscle. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo-117-4-1336>

673 Renard, E. (2018). [New modes of insulin delivery and new modes of monitoring of type  
674 1 diabetes mellitus]. *La Revue du praticien*, 68(6), 620–627.

675 Rocha, D. S., Casagrande, L., Model, J. F. A., dos Santos, J. T., Hoefel, A. L., & Kucharski,  
676 L. C. (2018). Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of  
677 diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.  
678 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.132>

679 Sato, J., Nasu, M., & Tsuchitani, M. (2016). Comparative histopathology of the estrous or  
680 menstrual cycle in laboratory animals. *Journal of Toxicologic Pathology*.  
681 <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0021>

682 Soltész, G., Patterson, C. C., & Dahlquist, G. (2007). Worldwide childhood type 1 diabetes  
683 incidence - What can we learn from epidemiology? *Pediatric Diabetes*.  
684 <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2007.00324.x>

685 Spriet, L. L. (1995). Caffeine and performance. *International Journal of Sport Nutrition*, 5  
686 *Suppl*, S84-99. <https://doi.org/10.1123/ijasn.5.s1.s84>

687 Strassmann, B. B., Vieira, A. R., Pedrotti, E. L., Morais, H. N. F., Dias, P. F., & Maraschin,  
688 M. (2008). Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex*  
689 *paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. *Journal of*  
690 *Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8348–8353. <https://doi.org/10.1021/jf801041f>

691 Tepavcevic, S., Koricanac, G., Zakula, Z., Milosavljevic, T., Stojiljkovic, M., & Isenovic, E.  
692 R. (2011). Interaction between insulin and estradiol in regulation of cardiac glucose and  
693 free fatty acid transporters. *Hormone and Metabolic Research*. [https://doi.org/10.1055/s-](https://doi.org/10.1055/s-0031-1280784)  
694 0031-1280784

---

695 Thaeomor, A., Teangphuck, P., Chaisakul, J., Seanthaweek, S., Somparn, N., &  
696 Roysommuti, S. (2017). Perinatal Taurine Supplementation Prevents Metabolic and  
697 Cardiovascular Effects of Maternal Diabetes in Adult Rat Offspring. *Advances in*  
698 *Experimental Medicine and Biology*, 975, 295–305. <https://doi.org/10.1007/978-94-024->  
699 1079-2\_26

700 Torres, I. L., Gamaro, G. D., Silveira-Cucco, S. N., Michalowski, M. B., Corrêa, J. B., Perry,  
701 M. L., & Dalmaz, C. (2001). Effect of acute and repeated restraint stress on glucose  
702 oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. *Brazilian Journal of Medical*  
703 *and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas /*  
704 *Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 34(1), 111–116.  
705 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000100013>

706 Valencak, T. G., Osterrieder, A., & Schulz, T. J. (2017). Sex matters: The effects of  
707 biological sex on adipose tissue biology and energy metabolism. *Redox Biology*, 12, 806–  
708 813. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.012>

709 Valitsky, M., Hoffman, A., Unterman, T., & Bar-Tana, J. (2017). Insulin sensitizer prevents  
710 and ameliorates experimental type 1 diabetes. *American Journal of Physiology.*  
711 *Endocrinology and Metabolism*, 313(6), E672–E680.  
712 <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00329.2016>

713 Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical*  
714 *Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90013-8)

715 Vázquez-Palacios, G., Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., & Velázquez-Moctezuma,  
716 J. (2001). Further definition of the effect of corticosterone on the sleep-wake pattern in the  
717 male rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/S0091->  
718 3057(01)00620-7

719 Wagle, S. R., Ingebretsen, W. R., & Sampson, L. (1975). Studies on gluconeogenesis and  
720 stimulation of glycogen and protein synthesis in isolated hepatocytes in alloxan diabetic,  
721 normal fed and fasted animals. *Acta Diabetologica Latina*.  
722 <https://doi.org/10.1007/BF02581299>



- 
- 723 Westwood, F. R. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological  
724 Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>
- 725 Winnick, J. J., Kraft, G., Gregory, J. M., Edgerton, D. S., Williams, P., Hajizadeh, I. A., ...  
726 Cherrington, A. D. (2016). Hepatic glycogen can regulate hypoglycemic counterregulation  
727 via a liver-brain axis. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI79895>
- 728 Yamada, Y., Nakazato, Y., & Ohga, A. (1989). The mode of action of caffeine on  
729 catecholamine release from perfused adrenal glands of cat. *British Journal of*  
730 *Pharmacology*, 98(2), 351–356. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb12603.x>
- 731 Zaharieva, D. P., & Riddell, M. C. (2013). Caffeine and glucose homeostasis during rest  
732 and exercise in diabetes mellitus. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*.  
733 <https://doi.org/10.1139/apnm-2012-0471>

734 **Table 1. Ovarian and pituitary profile of control and diabetic female rats after a 30-day treatment with *Ilex paraguariensis***  
 735 **extract.**

Parameter	Experimental Group				Kruskal-Wallis H (p)	
	C	CT	D	DT	Median (25/75)	K-W
FSH (ng/mL)	1.310 (0.97/1.69)	1.97 (1.53/5.32)	1.45 (1.38/2.56)	1.94 (1.65/2.32)	1.73 (1.37/2.35)	6.34 (ns)
LH (ng/mL)	0.57 (0.54/0.81)	0.93 (0.91/1.25)	0.86 (0.80/0.97)	0.71 (0.63/1.07)	0.96 (0.80/1.29)	5.91 (ns)
Progesterone (ng/mL)	3.54 (2.13/13.98)	8.09 (5.33/10.24)	4.52 (3.87/7.18)	7.19 (4.11/18.63)	5.55 (3.83/9.46)	2.360(ns)
Estradiol (pg/mL)	291.7 (15.42/739.0)	10.98 (9.58/47.60)	12.18 (7.31/45.63)	16.28 (11.12/17.99)	16.11 (11.19/59.74)	5.299(ns)
Corticosterone (nmol/L)	133.8 (91.38/187.4)	202.8 (178.9/223.2)	157.2 (98.26/193.6)	184.8 (111.2/218.8)	176.6 (134.4/205.4)	4.920(ns)

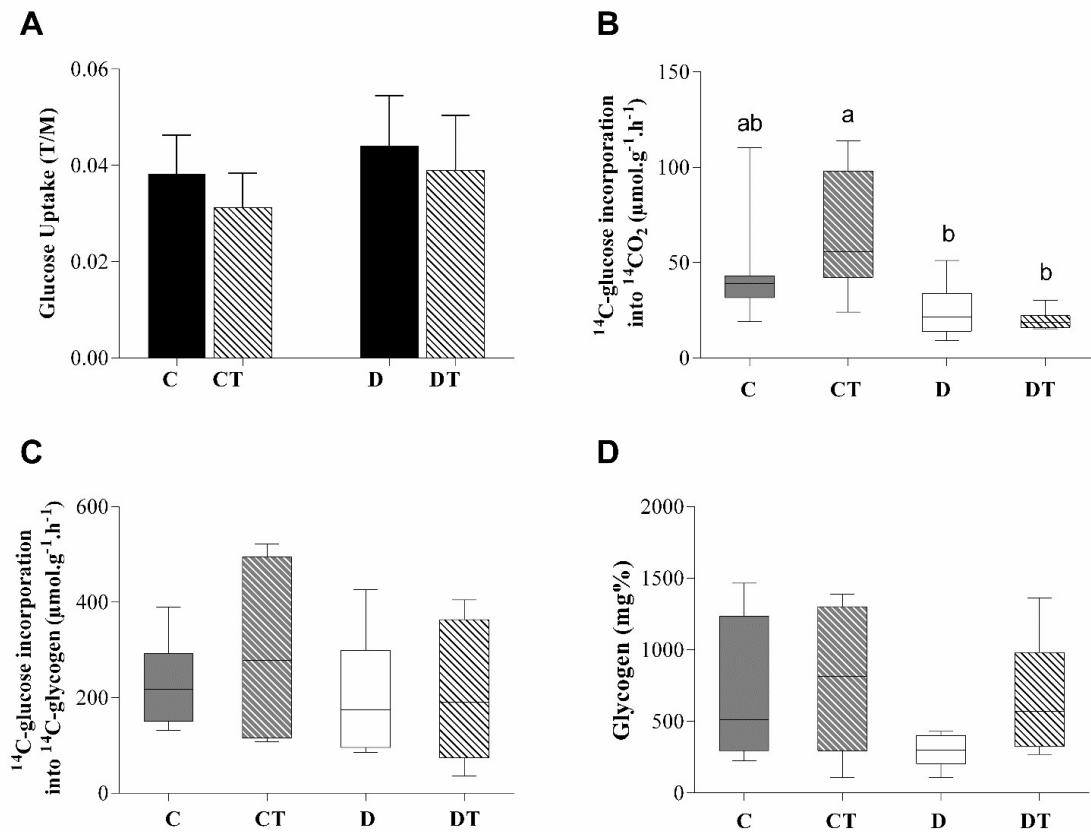
736 Results are expressed as median (25/75 interquartile range). Values with P < 0.05 were considered significant. ns = not  
 737 significant (n = 5-9 per group).

738 **Table 2. Serum biochemicals and morphometric parameters of control and diabetic female rats after 30-day treatment**  
 739 **with *Ilex paraguariensis* extract.**

Parameter	Experimental Group				Two-way ANOVA, F (p) / Kruskal-Wallis, H (p)			
	C	CT	D	DT	Diabetes	Treatment	Interaction	K-W
Glucose (mg/dL)	118.4 (112.1/137.3) a	146.9 (105.8/170.5) a	589.5 (529.3/642.3) <sup>b</sup>	523.6 (420.8/639.7) <sup>b</sup>	—	—	—	37.51 ( $<0.0001$ )
Insulin (ng/mL)	0.204 ± 0.13	0.336 ± 0.13	0.134 ± 0.05	0.236 ± 0.11	2.77 (ns)	5.25 (0.036)	0.08 (ns)	—
Triglycerides (mg/dL)	53.58 (36.12/85.23) a	47.8 (37.34/64.94) <sup>a</sup>	208.6 (108.0/460.6) <sup>b</sup>	213.5 (129.1/407.5) <sup>b</sup>	—	—	—	39.27 ( $<0.0001$ )
Cholesterol (mg/dL)	65.11 ± 11.86 <sup>a</sup>	67.29 ± 7.13 <sup>ab</sup>	94.87 ± 29.42 <sup>ab</sup>	98.07 ± 33.82 <sup>b</sup>	12.35 (0.0015)	0.09 (ns)	0.003 (ns)	—
HDL-cholesterol (mg/dL)	31.89 ± 9.05	28.89 ± 3.22	26.24 ± 6.25	24.03 ± 8.66	4.87 (0.035)	0.65 (ns)	0.002 (ns)	—
Glycerol (mmol/L)	0.38 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.466 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.822 ± 0.201 <sup>b</sup>	0.832 ± 0.229 <sup>b</sup>	44.06 ( $<0.0001$ )	0.53 (ns)	0.32 (ns)	—
Body weight gain (g)	52.25 ± 6.52 <sup>a</sup>	49.78 ± 15.84 <sup>a</sup>	18.89 ± 16.04 <sup>b</sup>	42.87 ± 21.37 <sup>a</sup>	13.74 (0.0008)	3.87 (ns)	5.86 (0.021)	—
Soleus index	0.00108 ± 0.0001	0.00119 ± 0.0004	0.00114 ± 0.0003	0.00101 ± 0.0001	0.6039 (ns)	0.0087 (ns)	1.996 (ns)	—
Liver index	0.046 ± 0.007	0.047 ± 0.004	0.046 ± 0.003	0.055 ± 0.006	0.0671 (ns)	0.025 (ns)	0.1026 (ns)	—

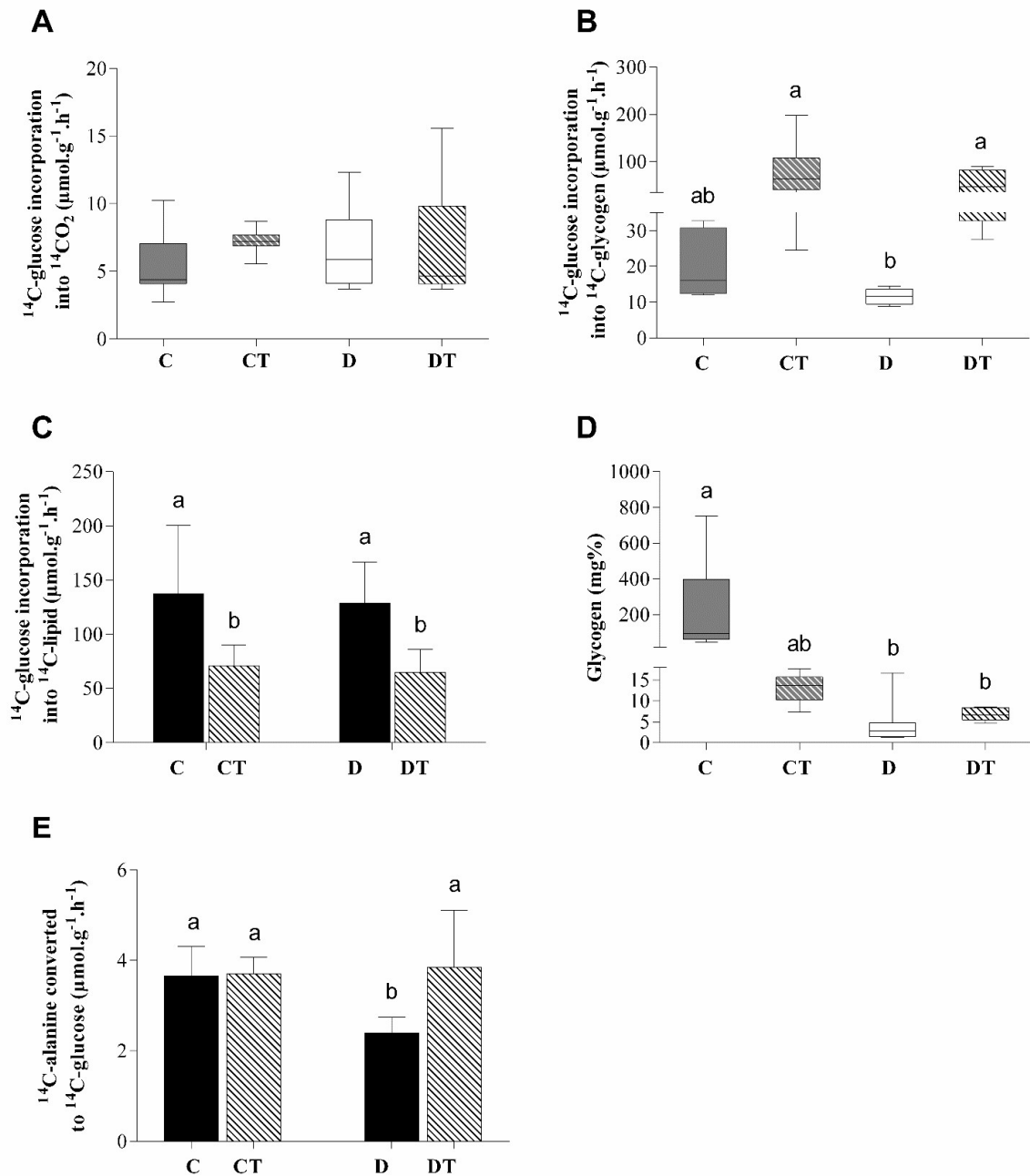
740 Results are expressed as mean ± SD or median (25/75 interquartile range). Differences among groups were tested by two-way  
 741 ANOVA or Kruskal-Wallis. Different letters indicate significant differences according to Tukey or Dunn post hoc. Values  
 742 with P < 0.05 were considered significant. ns = not significant (n = 5-9 per group).

**Figure 1**



**Figure 1.** Muscle metabolism in diabetic female rats treated with *Ilex paraguariensis* aqueous extract (30 days). The metabolism was observed as glucose uptake (A);  $^{14}\text{C}$ -glucose incorporation into  $\text{CO}_2$  (B) glycogen synthesis (C); glycogen content (D) Data are expressed as the mean  $\pm$  respective standard deviation (SD) or the median and 25/75 percentile. Differences among groups were tested by two-way ANOVA or Kruskal-Wallis. Different letters indicate differences according to Tukey or Dunn post hoc. Values with  $P < 0.05$  were considered significant. C: control; CT: control treatment; D: diabetes; DT: diabetes treatment (n=7-9).

Figure 2



**Figure 2.** Liver metabolism in diabetic female rats treated with *Ilex paraguariensis* aqueous extract (30 days). The metabolism was observed as  $^{14}\text{C}$ -glucose incorporation into  $\text{CO}_2$  (A), glycogen synthesis (B) and lipid synthesis (C); glycogen content (D); glucose production from  $^{14}\text{C}$ -alanine (E). Data are expressed as the mean  $\pm$  respective standard deviation (SD) or the median and 25/75 percentile. Differences among groups were tested by two-way ANOVA or Kruskal-Wallis. Different letters indicate differences according to Tukey or Dunn post hoc. Values with  $P < 0.05$  were

---

considered significant. C: control; CT: control treatment; D: diabetes; DT: diabetes treatment (n=7-9).

---

## 6. DISCUSSÃO

A presença de inúmeros fotoquímicos de interesse para o uso em saúde humana foi descrita nas mais diversas formas de preparação do extrato de *I. paraguariensis* (BIXBY *et al.*, 2005; GAMBOA-GÓMEZ *et al.*, 2015; MESSINA *et al.*, 2015). Seu consumo difundido pela população do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina facilitou inclusive a análise de seus efeitos em humanos, incrementando as análises realizadas em modelo animal e *in vitro* (ARÇARI *et al.*, 2009; GAMBERO; RIBEIRO, 2015). Contudo, ainda são poucos os grupos de pesquisa que avaliem seu potencial nutracêutico. Tal fato, certamente é influenciado pela sua menor popularidade diante de plantas mundialmente comercializadas, mesmo que esse extrato já tenha mostrado propriedades desejáveis, como ação antioxidante, comparáveis àquelas observadas no chá verde, o qual é mundialmente conhecido, comercializado e estudado (GAO *et al.*, 2013; HECK; DE MEJIA, 2007; PAMPLONA MOSIMANN; WILHELM-FILHO; DA SILVA, 2006).

### 6.1. Composição do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*

Diante a concentração das frações bioativas, é importante ressaltar que esta planta apresenta grande variabilidade na quantidade de tais compostos. No trabalho intitulado “**Adipose tissue of female Wistar rats respond to *Ilex paraguariensis* treatment after ovariectomy surgery**”, o extrato apresentou aproximadamente  $5,244 \pm 0,124$  g% de fenóis totais;  $1,007 \pm 0,038$  g% de cafeína; e  $0,197 \pm 0,007$  g% de teobromina. No trabalho intitulado “***Ilex paraguariensis* modulates liver metabolism in diabetic female Wistar rats**”, o extrato apresentou  $4,661 \pm 0,09$  g% de fenóis totais;  $1,115 \pm 0,029$  g% de cafeína; e  $0,168 \pm 0,005$  g% de teobromina. Não houve expressiva variação nas concentrações dos compostos nos dois lotes utilizados, porém a variabilidade foi previamente ressaltada por outros autores (COELHO *et al.*, 2007; DARTORA *et al.*, 2011; H. M. BASTOS *et al.*, 2006; HECK; SCHMALKO; DE MEJIA, 2008; RIACHI *et al.*, 2018). Esta diferença pode ser consequência do método de cultivo, do processamento e até mesmo do método de preparação para consumo (COELHO *et al.*, 2007; DARTORA *et al.*, 2011; H. M. BASTOS *et al.*, 2006; HECK; SCHMALKO; DE MEJIA, 2008; RIACHI *et al.*, 2018). Invariavelmente, os resultados aqui apresentados sobre os efeitos biológicos de *Ilex*

---

*paraguariensis* correspondem ao seu extrato aquoso e ao teor de metilxantinas e fenóis totais aqui descritos.

A grande diversidade genética e ambiental dos ervais nativos tem se apresentado como um empecilho para a investigação dos efeitos biológicos em ensaios controlados, isso porque eventualmente ocorrem discordâncias em relação aos efeitos biológicos na literatura, atrasando a compreensão de seu potencial nutracêutico. Entretanto, o mapeamento genômico recente dos diversos tecidos desta planta trouxe novamente a possibilidade de investida mais efetiva, não apenas com a finalidade no aumento da produção na indústria, mas também no melhoramento de linhagens para aplicação em saúde, modulando as concentrações dos fotoquímicos conforme a necessidade de uso terapêutico (FAY *et al.*, 2018).

**6.2. Discussão do trabalho “*Adipose tissue of female Wistar rats respond to Ilex paraguariensis treatment after ovariectomy surgery*”** (Periódico: Journal of Traditional and Complementary Medicine. ISSN 2225-4110)

O objetivo deste trabalho foi avaliar a vias metabólicas alteradas em fêmeas submetidas à ovariectomia e, posteriormente, investigar a eficácia na utilização do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* como modulador do metabolismo lipídico.

Em animais após 45 dias de tratamento, o extrato de erva mate foi capaz de reduzir os níveis séricos de triglicerídeos em não somente machos, mas também fêmeas ovariectomizadas. Estes dados confirmam sua capacidade de modular o perfil lipídico, como descrito por outros autores (CHOI *et al.*, 2017; DE MENESES FUJII *et al.*, 2014). Particularmente, neste trabalho foi mostrado que tal melhora ocorreu no grupo macho controle, o que ressalta o potencial modulador lipídico deste extrato, o qual, por consequência, do atenuador do risco para desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares. De maneira inédita, avaliamos o efeito de *I. paraguariensis* em fêmeas ovariectomizadas. O efeito nesse grupo revela a potencialidade do seu uso na atenuação do desequilíbrio energético concomitante ao período pós-menopausa. Assim, este extrato pode atuar mitigando a concentração de triglicerídeos circulantes, diminuindo este fator de risco em fêmeas estrógeno-deficientes.



---

O ganho de peso total nos machos não sofreu efeito do tratamento, porém nas fêmeas ovariectomizadas o ganho de peso diminuiu, e a diferença, antes observada em relação às fêmeas sham (ovariectomizadas vs controles), não foi mais verificada após o tratamento. Nenhum dos depósitos de tecido adiposo avaliado sofreu interferência da castração ou do tratamento, apenas o tecido adiposo branco gonadal do grupo fêmea controle diminuiu devido ao tratamento. O efeito da erva mate sobre o ganho de peso foi descrito por diversos autores em protocolos de obesidade (DE MENESES FUJII *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2014), mas não usando fêmeas com base do modelo experimental. Assim, estudando seus efeitos em fêmeas ovariectomizadas foi possível observar dados inéditos, tais como atenuação do ganho de peso em fêmeas deficientes em estrogênios. Tal dado poderia ser considerado para investigação do efeito do mate em mulheres pós-menopausa, as quais apresentam alteração no padrão de adiposidade (para padrão andrógênio) e ganho de peso aumentado.

O tecido adiposo marrom (TAM) foi avaliado quanto à conversão de glicose em CO<sub>2</sub> e em lipídeos, e quanto à capacidade lipolítica basal e estimulada *in vitro* por epinefrina. Nenhum efeito foi observado decorrente da intervenção ou tratamento. Ou seja, machos e fêmeas não apresentaram diferenças entre os grupos quanto à oxidação de glicose, lipogênese, lipólise basal ou lipólise estimulada. Ainda, os resultados mostram que a sensibilidade do TAM à epinefrina é mantida em todos os grupos.

Os resultados do experimento indicam que a atividade metabólica de TAM, em especial a expressiva sensibilidade à epinefrina, foi mantida mesmo após a castração ou tratamento. Tal desfecho parece benéfico, uma vez que a manutenção das atividades de lipólise e  $\beta$ -oxidação são cruciais para sua função de tamponamento dos lipídeos da corrente sanguínea (HOEKE *et al.*, 2016).

Quanto ao metabolismo no tecido adiposo branco visceral (TABv), a conversão de glicose em CO<sub>2</sub> e em lipídeos não foi alterada pelo tratamento em machos controle. Entretanto, as fêmeas ovariectomizadas apresentaram diminuição significativa desses parâmetros, quadro este revertido após 45 dias de tratamento com extrato, em que houve retorno da oxidação e lipogênese a partir de glicose para o nível das fêmeas controle.

---

A diminuição da oxidação de glicose a CO<sub>2</sub> e a sua conversão em lipídeos podem indicar uma diminuição da sensibilidade à insulina após a castração das fêmeas. Este mesmo padrão de resposta pôde ser observado em camundongos C57BL/ 6J obesos, nos quais ocorre diminuição do consumo de oxigênio e da tolerância a glicose, bem como menor quantidade de metabolitos envolvidos no metabolismo mitocondrial e de proteínas na cadeia respiratória (CUMMINS *et al.*, 2014). Assim, a ovariectomia após 45 dias, uma vez que acarretou no aumento de peso das fêmeas, pode ter alterado significativamente a utilização de glicose de tecidos-chave, como músculo e tecido adiposo, levando progressivamente ao desenvolvimento de resistência à insulina (PARK *et al.*, 2016).

O tratamento com erva mate, por sua vez, foi capaz de fazer com que a oxidação e a lipogênese voltassem aos valores controle. Para explicar tal desfecho, estudos em animais mostraram que *I. paraguariensis* é capaz de alterar a sinalização da insulina, mediante a ativação da via AKT (DE MENESES FUJII *et al.*, 2014), bem como diminuir a absorção intestinal de glicose via SGLT-1 (PEREIRA *et al.*, 2012). Assim este extrato parece melhorar o perfil de resposta à insulina, efeito nunca mostrado em fêmeas castradas, reforçando o uso potencial deste extrato na diminuição dos fatores de risco de desequilíbrio metabólico em fêmeas / mulheres deficientes em estrógeno.

Ainda relativo ao metabolismo no tecido adiposo branco visceral, nenhuma diferença foi observada em relação à lipólise basal de machos e fêmeas. Entretanto, a epinefrina exerceu efeito sobre a liberação de glicerol em machos controle, mas não em fêmeas controle. Ainda, após o tratamento com extrato, os machos passaram a não responder à estimulação com epinefrina. A ausência de resposta das fêmeas controle foi mantida no grupo em fêmea ovariectomizada. Como esperado, o TAB visceral de machos apresenta maior sensibilidade à estimulação lipolítica em comparação com fêmeas. Contudo o TAB visceral de machos tratados com erva mate apresenta menor sensibilidade à epinefrina. Em indivíduos obesos a contribuição do TAB visceral é maior do que o TAB subcutâneo, isso porque é mais sensível as catecolaminas circulantes, contribuindo com o aumento de ácidos graxos na corrente sanguínea, maior risco de acúmulo de lipídeos ectópicos e desenvolvimento de resistência à insulina (VAN DAM *et al.*, 2017). Assim, a

---

diminuição da sensibilidade à epinefrina após tratamento ressalta que este extrato é capaz de diminuir a contribuição do TAB visceral no aumento dos lipídeos circulantes frente à estimulação. Assim, os resultados indicam que o extrato, em machos, leva a uma melhora no perfil de estoque e mobilização de um depósito chave no estabelecimento da obesidade central. Em fêmeas o TAB visceral naturalmente apresenta menor taxa de lipólise, o que caracteriza o padrão de estoque, o que não foi afetado pelo tratamento. Desde modo, o extrato tem efeito dependente do sexo, contribuindo em machos para diminuição do aporte de lipídeos circulantes advindos do TABv (VAN DAM *et al.*, 2017).

O tecido adiposo branco retroperitoneal (TABr) exibiu o mesmo padrão de resposta à intervenção e ao tratamento observado no TABv em se tratando da conversão de glicose em CO<sub>2</sub> e lipídeos. Não houve efeito nos machos; contudo, em fêmeas ovariectomizadas, houve diminuição significativa de ambos os fenômenos, revertida pelo tratamento com extrato para os valores encontrados nos controles.

A captação de glicose provavelmente se encontra muito alterada nos depósitos de tecidos adiposo branco em fêmeas após a ovariectomia, algo já descrito em músculo e tecido adiposo branco (PARK *et al.*, 2016), levando ao desenvolvimento progressivo da resistência à insulina. O tratamento por sua vez, foi capaz de reverter esse processo, indicando uma melhora na homeostase da glicose e certamente retardando a progressão da resistência à insulina.

Ainda, a lipólise basal e estimulada do TABr não sofreu alteração nem da intervenção nem do tratamento, permanecendo irrelevante em comparação com os demais depósitos. Como já ressaltado, o TAB de machos apresenta maior responsividade a estimulação lipolítica em comparação com fêmeas. Contudo o TAB retroperitoneal de machos e fêmeas não apresentou responsividade à epinefrina. A menor contribuição com a concentração de lipídeos circulantes, mantida mesmo após o tratamento, caracteriza um padrão de estoque (VAN DAM *et al.*, 2017). É importante ressaltar que a extrapolação de roedores para humanos deve ser feita com cautela, mostrando que são necessários mais estudos para a confirmação desse padrão de resposta (KARASTERGIU; FRIED, 2017; NEWELL-FUGATE, 2017).

---

Novamente, o extrato parece interferir de maneira benéfica na oxidação e lipogênese do TABr de fêmeas após 45 dias de ovariectomia, incrementando as vias de síntese e reestabelecendo o fluxo de lipídeos para tecido adiposo e retirando-os da corrente sanguínea.

Em se tratando do TAB gonadal (TABg), houve aumento da síntese de lipídeos a partir de glicose em fêmeas ovariectomizadas após 45 de tratamento. TABg apresenta grande plasticidade de resposta diante de diferentes tratamentos, contudo, cabe salientar que este depósito é muito importante em roedores, mas não necessariamente isso pode ser extrapolado para humanos (KARASTERGIU; FRIED, 2017). Assim, o aumento da síntese de lipídeos no TABg das fêmeas ovariectomizadas, inicialmente indica resposta benéfica ao tratamento com extrato, sinalizando o aumento do *buffering* de glicose para estoque, mas a extrapolação para humanos não pode ser feita de maneira tão direta.

Neste trabalho, foi avaliado o uso potencial do extrato de *Ilex paraguariensis* como agente preventivo e/ou terapêutico do desequilíbrio energético em ratas estrógeno-dependentes. Esta possibilidade foi confirmada, uma vez que o extrato foi capaz de promover melhora no padrão de estoque e mobilização de lipídeos em machos e fêmeas. Particularmente, esse efeito se mostrou sexo-dependente, modulando vias lipogênicas em fêmeas e lipolíticas em machos. Sendo assim, considerando o aumento mundial de eventos de desequilíbrio energético lipídico e o aumento da prevalência desses eventos em mulheres após a menopausa, o extrato se mostrou um excelente candidato nutracêutico na prevenção e/ou tratamento de distúrbios energéticos.

### **6.3. Discussão do trabalho “*Ilex paraguariensis* effects on liver and muscle metabolism in diabetic female Wistar rats”** (Food Research International. ISSN: 0963-9969)

O objetivo deste trabalho foi avaliar a vias metabólicas alteradas em fêmeas submetidas ao modelo de diabetes melito tipo 1 (DM1) e, posteriormente, investigar a eficácia na utilização do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* como modulador do metabolismo de carboidratos e lipídeos.

---

O perfil hormonal do eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano foi avaliado inicialmente como fator confirmatório da correta triagem, pela análise do esfregaço vaginal, das fêmeas em diestro. Todas as amostras avaliadas apresentaram o perfil de diestro, com concentrações baixas de FSH, LH e progesterona, confirmando o indicado pelo perfil morfométrico do esfregaço vaginal, (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007; SATO; NASU; TSUCHITANI, 2016; WESTWOOD, 2008). Sendo assim, os dados posteriormente apresentados representam exclusivamente o metabolismo na fase de diestro, e os desfechos aqui observados não estão mascarados pela alteração cíclica do metabolismo nas diferentes fases do ciclo.

Também foram avaliados os níveis de corticosterona plasmática. Os valores de corticosterona de todos os grupos apresentaram-se dentro da faixa normal característica de animais não estressados. Também, após avaliação individual, os valores mais altos deste hormônio encontrados no presente estudo ainda assim permaneceram abaixo do indicativo de estresse (LECHNER *et al.*, 2000; PÉREZ-NIEVAS *et al.*, 2007; VÁZQUEZ-PALACIOS *et al.*, 2001). Os dados aqui apresentados, portanto, não possuem interferência da ação da corticosterona sobre o metabolismo energético, assegurando a eliminação desta variável como fator de interferência (JANI; TELANG; KATYARE, 1991; JIMENO; HAU; VERHULST, 2018).

Os valores de glicose e triglicerídeos foram os parâmetros que mais representaram o perfil sérico-bioquímico do DM1 não tratado, após 30 dias. Contudo, a insulina das ratas diabéticas não se mostrou diminuída. Além disso, a alteração marcante no perfil lipídico também pode ser observada, possibilitando o estudo de diversos candidatos a agente terapêutico para disfunção do metabolismo lipídico (MERZOUK *et al.*, 2000; WARD *et al.*, 2001).

Contudo, não foi observada diminuição de insulina plasmática 30 dias após a injeção de estreptozotocina, fato que não corrobora a literatura clássica (TANCRÈDE; ROUSSEAU-MIGNERON; NADEAU, 1983). Diante disso, é importante salientar que alguns autores já descreveram que o desenvolvimento de DM1 em fêmeas possui algumas peculiaridades tanto em humanos quanto em modelos animais. Em camundongos NOD, observou-se hiperglicemia, mas índice de insulinite igual ao dos animais controle (VALITSKY *et al.*, 2017a). Em um estudo avaliando ratos Wistar machos e fêmeas diabéticos submetidos ao tratamento com Taurina, fêmeas diabéticas sem tratamento mostraram hiperglicemia mais branda em relação aos machos (THAEOMOR *et al.*, 2017). Mais ainda, com essa

---

abordagem terapêutica, não houve diferença nos níveis de insulina circulante entre fêmeas diabéticas e o grupo controle. Thaeomor *et al.*,(2017) destacaram a suscetibilidade maior de machos (camundongos e ratos) ao protocolo com STZ comparada a fêmeas, ressaltando que machos tendem a ter maior índice de insulinite, perda de peso corporal, menor concentração de insulina circulante. Tais achados têm evidenciado que há menor eficácia na indução de DM1 em fêmeas nas mesmas doses utilizadas para machos, sendo as fêmeas mais resistentes aos protocolos tradicionais. (BELL *et al.*, 1994; CORTRIGHT *et al.*, 1997; DEEDS *et al.*, 2011; GOYAL *et al.*, 2016).

Quanto ao tratamento, o extrato de *Ilex paraguariensis* apresentou efeito sobre os níveis circulantes de insulina, os quais se apresentaram aumentados tanto nas ratas controle quanto diabéticas. Contudo outros parâmetros avaliados ainda se mantiveram entre esses dois grupos. Esses dados devem ser interpretados com cautela, pois mesmo diante da diferença estatística relativa ao tratamento, não houve diferença no pós-teste. Outros autores descreveram a proteção contra o dano por STZ em ratos, preservando a secreção de insulina após pré-tratamento com cafeína, a qual é fração de predominante do extrato de *Ilex paraguariensis* (KAGAMI *et al.*, 2008), mostrando que o extrato pode modular a glicemia e insulinemia *in vivo* (PANG; CHOI; PARK, 2008) em modelos de obesidade induzida por dieta.

Os níveis de glicerol plasmático apresentaram-se mais altos nas fêmeas diabéticas. Esta observação pode representar a depleção das reservas energéticas do tecido adiposo, convertidas de triacilglicerol em ácidos graxos livres e glicerol, os quais são exportados para a corrente sanguínea (LUCIER; WEINSTOCK, 2019). No estado de balanço negativo e progressivo, a mobilização subsequente das reservas musculares indica estado energético crítico, em que todas as demais reservas de carboidratos e lipídios já foram comprometidas, sendo a sua progressão um fator extremamente grave (LUCIER; WEINSTOCK, 2019). Particularmente, a liberação sustentada de glicerol nas fêmeas diabéticas indica um recurso vantajoso, pois aponta um atraso na depleção das reservas proteicas musculares, fato corroborado pela preservação do peso muscular. A liberação prolongada de glicerol indica, portanto, a manutenção muscular e atraso na descompensação energética.

Esse fato poderia ser explicado pelo viés de gênero no metabolismo lipídico, o qual tem preferencialmente balanço positivo nas fêmeas (VALENCAK; OSTERRIEDER; SCHULZ, 2017). Neste caso, em especial, a gliconeogênese pode

---

ser uma via chave, uma vez que restringe a lipólise, retardando o balanço negativo energético, a cetogênese, proteólise, entre outros fatores indicativos de catabolismo expressivo (HANSON; RESHEF, 2003). A gliconeogênese será discutida mais adiante nos resultados do metabolismo hepático.

Como salientado anteriormente, o perfil hormonal hipotálamo-hiposifário-ovariano foi verificado, além dos níveis de corticosterona. Nenhum dos fatores foi capaz de interferir no perfil hormonal no diestro, ainda que o diabetes possa levar, em longo prazo, a alterações no perfil secretório desses hormônios, impactando os processos relacionados à fertilidade (LEE *et al.*, 2019). A corticosterona também não apresentou alteração entre os grupos, o que também descarta a interferência do extrato por meio da modulação dos níveis circulantes deste hormônio e suas consequências para o metabolismo energético. É possível concluir que as fêmeas, previamente escolhidas com base na morfologia celular do esfregaço vaginal, estavam todas em diestro e não apresentaram indicadores hormonais de estresse crônico elevados. Sendo assim, o perfil metabólico hepático e muscular aqui apresentados não são consequência alteração da concentração pontual destes hormônios como consequência de diferentes fases do ciclo estral.

O ganho de peso corporal se apresentou diminuído nas ratas DM1, ponto que corrobora a literatura prévia, na qual o ganho de peso apresenta-se muito prejudicado diante do catabolismo predominante em consequência do quadro crônico de diabetes não tratado (AL-ACHI; GREENWOOD, 2001). Tal informação confirma um estado catabólico predominante, mesmo diante da manutenção da insulinemia, levando a caracterização de um DM1 severo. Já o tratamento com *Ilex paraguariensis* foi capaz de reestabelecer o ganho de peso das ratas DM1, sendo iguais dos níveis dos controles, revelando uma possível atenuação do estado catabólico da doença.

O metabolismo muscular foi avaliado quanto a captação, oxidação e lipogênese a partir de glicose além do conteúdo de glicogênio tecidual. As fêmeas DM1 não apresentaram diferença na captação, na síntese de glicogênio e no glicogênio tecidual quando comparadas aos controles. Já avaliando a oxidação tecidual de glicose, as ratas DM1 apresentaram valores diminuídos. A oxidação de glicose muscular diminuída reafirma o desenvolvimento de disfunção na sinalização da insulina combinada à hiperglicemia, levando a menor utilização de glicose para a síntese de ATP. Entretanto, a manutenção da captação de glicose, da glicogênese

---

e da concentração de glicogênio tecidual devem ser interpretados com cuidado, pois indicam um perfil mais brando de disfunção da sinalização de insulina no músculo.

O papel do estradiol no tecido muscular esquelético é um ponto a ser sublinhado, uma vez que já foram descritos inúmeros efeitos protetores deste hormônio, como aumento de sensibilidade muscular à insulina como evidenciado pelo aumento na translocação de GLUT-4 e da captação de glicose em fêmeas castradas quando comparadas às castradas sem tratamento (BARROS; GUSTAFSSON, 2011; LI *et al.*, 2018; TEPAVCEVIC *et al.*, 2011). Assim sendo, tal ação protetora do estradiol parece levar ao desenvolvimento de diabetes com fenótipo mais brando quando comparadas aos machos submetidos ao mesmo protocolo.

Quanto ao tratamento com *Ilex paraguariensis*, não foram observados efeitos significativos no metabolismo muscular. A explicação para tal fato seria novamente pelo fenótipo brando aqui observado de DM1 em fêmeas. A manutenção do peso do músculo reafirma a preservação deste tecido em fêmeas. Sendo assim, o extrato de *I. paraguariensis* não teria grande protagonismo frente ao já conhecido efeito protetor do estradiol em se tratando de metabolismo energético muscular (BARROS; GUSTAFSSON, 2011; NADAL-CASELLAS *et al.*, 2012; PUAH; BAILEY, 1985; TEPAVCEVIC *et al.*, 2011).

Os mecanismos de alteração hepática associados ao DM1 estão muito bem caracterizados na literatura. A glicose é liberada pelo tecido hepático tanto por aumento na degradação dos estoques de glicogênio, como também pela gliconeogênese, contribuindo ainda mais para a hiperglicemia sustentada. Ainda a oxidação de glicose esta diminuída e o perfil lipídico alterado leva ao acúmulo excessivo deste substrato no fígado (esteatose) (BUNIAM *et al.*, 2019; DAS; PADAYATTI; PAULOSE, 1996).

O metabolismo hepático foi estudado em relação a oxidação, glicogênese, lipogênese a partir de glicose, glicogênio total e produção de glicose a partir de alanina. O fígado das fêmeas DM1 não apresentou alteração na oxidação, glicogênese e lipogênese a partir de glicose. Entretanto as fêmeas diabéticas apresentaram diminuição dos níveis de glicogênio tecidual e da síntese de glicose a partir de alanina.

A depleção dos estoques de glicogênio corrobora os dados já descritos na literatura, os quais afirmam o balanço negativo e dos estoques energéticos no DM1



---

(HERZIG *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2019; KISHORE *et al.*, 2006; WINNICK *et al.*, 2016). Porém a diminuição da gliconeogênese deve ser avaliada com cautela. Os dados aqui apresentados descrevem a contribuição relativa da alanina para gliconeogênese hepática, e não necessariamente retratam a gliconeogênese global. Assim o ensaio com alanina não seria determinante para a afirmação de que a gliconeogênese está diminuída nos animais diabéticos neste estudo. Outros autores já ressaltaram a discrepância na literatura com relação a contribuição de diferentes substratos para produção de glicose no fígado (AKIMOTO *et al.*, 2000; CHUNG *et al.*, 2015). Em especial, autores que utilizaram animais com diabetes induzida por aloxano já encontraram contribuição nula da alanina para gliconeogênese neste tecido (WAGLE; INGEBRETSEN; SAMPSON, 1975). Além disso, salientam que, na ausência da ação da insulina, esta via é altamente modulada pela a concentração dos diferentes substratos, os quais podem contribuir a partir de diferentes etapas desta via. O glicerol, o lactato e a glutamina sanguíneos entre outros, têm contribuição expressiva na gliconeogênese, podendo ser utilizados quando em concentração relativa aumentada (CHUNG *et al.*, 2015).

Posto isso, vale ressaltar ainda que a alanina no DM1 é liberada principalmente pelo balanço energético negativo muscular e conseqüente predomínio de vias de proteólise (KARL; GARBER; KIPNIS, 1976). Os dados aqui apresentados no musculo esquelético mostram que as ratas DM1 não representam balanço negativo expressivo neste tecido, sendo razoável supor que a alanina não seja o substrato preferencial do tecido hepático para a gliconeogênese nas fêmeas, já bem estudado em machos. Assim, a diminuição da contribuição da alanina para síntese de glicose nas DM1 em relação aos controles pode ser explicada pela utilização de outro substrato na via.

Avaliando os níveis de glicerol plasmáticos, essa hipótese pode ser confirmada. Como já descrito, a concentração desse substrato encontra-se aumentada nas fêmeas diabéticas. Diante da manutenção da massa muscular, da importância do glicerol como precursor, e da diminuição da contribuição da alanina, há grande indicativo de que o glicerol está contribuindo expressivamente mais do que a alanina para a produção de glicose hepática, levando a diminuição relativa da entrada da alanina nesta via.

A ausência de alteração nos demais indicadores do estado energético também deve ser comparada com a literatura previa, mas com algumas ressalvas.

---

Novamente, diversos autores descrevem que o estradiol atua de maneira importante na sinalização da insulina no tecido hepático. Tal ação protetora leva ao aumento na sensibilidade a ação da insulina e conseqüente atenuação da esteatose, diminuição da oxidação lipídica e outros diversos indicadores de desequilíbrio energético (BUNIAM *et al.*, 2019; GOWRI *et al.*, 2007). Dito isso, é coerente atribuir o fenótipo mais brando no desequilíbrio energético do DM1 em fêmeas graças à ação protetora do estradiol quando comparadas aos machos.

Quando ao tratamento com *I. paraguariensis*, a gliconeogênese hepática a partir de alanina das ratas DM1 retornou aos níveis basais. Além disso, os grupos controle e diabetes apresentaram lipogênese a partir de glicose diminuída. A estimulação da gliconeogênese pela cafeína, presente no extrato, já é descrita, sendo um ponto contraditório para a pressuposição do uso de *I. paraguariensis* por pacientes com DM1. O efeito agudo da cafeína pela inibição dos receptores de adenosina, aumento do AMPc intracelular e estimulação da produção hepática de glicose parece contrário ao mecanismo de ação antidiabético desejado. Entretanto, já foi ressaltado que em adolescentes com DM1 tratado, a cafeína previne a hipoglicemia durante o exercício, o que levaria ao aumento da aderência aos protocolos de exercício. Em longo prazo, já se sabe dos benefícios da aclimação metabólica ao treinamento na sinalização à insulina e diminuição da necessidade de fármacos sensibilizadores, o que, dessa forma traz as metilxantinas como potenciais adjuvantes terapêuticos no DM1 (CZENCZEK-LEWANDOWSKA *et al.*, 2019). As saponinas do extrato de *I. paraguariensis* também são bons candidatos. Mesmo não sendo encontrados muitos estudos com a avaliação dos efeitos biológicos destes compostos, outros tipos extratos com saponinas distintas têm apresentado grande potencialidade na estimulação direta da sinalização da via IRS1/PI3K/AKT no fígado (GUO *et al.*, 2019).

Por fim, a diminuição da lipogênese em controles e diabéticas tratadas com *I. paraguariensis* parece corresponder ao mecanismo clássico estimulatório das metilxantinas, tanto pelo aumento da concentração circulante de catecolaminas, como pela ação direta nos receptores de adenosina, aumentando a liberação de ácidos graxos e levando ao catabolismo lipídico. Com os ensaios aqui apresentados, é difícil concluir se a ação hepática deste extrato em ratas DM1 é benéfica. Entretanto, diversos autores ressaltam que este extrato contribuiu com a atenuação do desequilíbrio no perfil lipídico em ratos expostos à dieta hiperlipídica ou

---

voluntários saudáveis, e foi capaz de diminuir a disfunção do metabolismo hepático de lipídios, atenuando marcadores de esteatose e melhorando o perfil de HDL, triglicerídeos, VLDL e LDL (GAMBERO; RIBEIRO, 2015; GAO *et al.*, 2013).

O presente estudo abordou pela primeira vez o efeito de *Ilex paraguariensis* em fêmeas diabéticas, as quais parecem apresentar fenótipo distinto dos machos submetidos ao mesmo protocolo de DM1. Os dados expostos mostram que *Ilex paraguariensis* foi capaz de modular vias chave do metabolismo hepático, em especial a gliconeogênese e a lipogênese, fato que reafirma a possibilidade do seu uso em doenças metabólicas crônicas. Contudo, mais estudos são necessários para a elucidação dos mecanismos envolvidos nos desfechos mostrados a fim de confirmar e trazer novas perspectivas para o seu uso como potencial nutracêutico.

#### 6.4. DISCUSSÃO GERAL

O consumo difundido do extrato de *Ilex paraguariensis* nos países da América do Sul e a sua popularidade pelos efeitos estimulante e antiobesidade têm despertado interesse da comunidade científica (DICKEL; RATES; RITTER, 2007). Sendo assim, já foram conduzidos estudos em humanos, os quais têm mostrado potenciais efeitos benéficos (ANDERSEN; FOGH, 2001; KIM *et al.*, 2015; YAMADA; NAKAZATO; OHGA, 1989). Contudo, os mecanismos e a dose necessária para tais efeitos ainda não foram elucidados.

A inclusão obrigatória de mulheres em estudos clínicos é recente (1993). A pesquisa básica ainda é dominada por estudos com machos, levando a obstáculos na aplicabilidade de tais estudos para toda a população, em especial para mulheres. Ainda recentemente, no campo da fisiologia, apenas um estudo em cada 3,7 considera o viés de gênero (ZUCKER; BEERY, 2010). A variação metabólica relacionadas ao ciclo está entre as maiores dificuldades descritas pelos pesquisadores das áreas básicas. Por outro lado, inúmeros estudos têm descrito que estas variações devem ser consideradas e incluídas em estudos com modelo animal, facilitando a triagem de agentes terapêuticos e aproximando estes trabalhos da aplicabilidade clínica.

Os resultados apresentados aqui, mostraram que o extrato tem potencialidade terapêutica para mulheres em pós-menopausa, uma vez que o consumo de *I.*

---

*paraguariensis* diante da diminuição dos esteroides sexuais femininos, causou efeitos marcantes no metabolismo do tecido adiposo. Além disso, deve ser investigada a possibilidade de seu uso como adjuvante terapêutico para mulheres em desenvolvimento de obesidade durante a menopausa, reduzindo a dosagem necessária de drogas antidiabéticas e seus eventuais efeitos colaterais.

Nossos dados também abordaram, pela primeira vez, o efeito de *Ilex paraguariensis* em fêmeas diabéticas, as quais parecem apresentar fenótipo distinto dos machos submetidos ao mesmo protocolo de DM1. Nesse âmbito, se faz necessária a investigação dos mecanismos de indução do diabetes experimental e do efeito deste extrato em fêmeas para que o viés de gênero não se apresente como um fator impeditivo da replicabilidade dos estudos em humanos.

## 7. CONCLUSÕES

No artigo “***Adipose tissue of female Wistar rats respond to Ilex paraguariensis treatment after ovariectomy surgery***”, os resultados mostraram que o tratamento com o extrato levou ao ganho de peso reduzido em fêmeas ovariectomizadas. A concentração de triglicerídeos diminuiu nos machos e nas fêmeas. A oxidação da glicose e a síntese de lipídeos nos tecidos adiposo visceral e retroperitoneal foram restauradas em fêmeas ovariectomizadas após o tratamento. A resposta à adrenalina diminuiu no tecido adiposo visceral de machos controle; no entanto, a lipólise em fêmeas não respondeu à ovariectomia ou ao tratamento. Esses dados destacam, de maneira inédita, os efeitos potenciais de *I. paraguariensis* no metabolismo lipídico de ratas ovariectomizadas, modulando as vias lipogênicas em fêmeas e as vias lipolíticas em machos. Além disso, a abordagem de sexo aplicada neste estudo contribui para um rastreamento mais eficaz dos efeitos das substâncias bioativas de *I. paraguariensis*.

No artigo “***Ilex paraguariensis effects on liver and muscle metabolism in diabetic female Wistar rats***” as fêmeas diabéticas apresentaram liberação sustentada de glicerol, possivelmente devido a um atraso no esgotamento das reservas de proteína muscular, indicando uma característica vantajosa relativa ao sexo feminino. O extrato foi capaz de melhorar os níveis de insulina em ratas controle e diabéticas e diminuir a lipogênese hepática em ratas controle e diabéticas. Nas

---

fêmeas com diabetes tratadas com extrato, a gliconeogênese hepática retornou aos níveis basais. Até onde sabemos, o presente estudo foi o primeiro a avaliar o efeito de *I. paraguariensis* em ratas diabéticas, que parecem apresentar fenótipo distinto em comparação com machos submetidos ao mesmo protocolo de indução de DM1. Os dados apresentados mostram que *I. paraguariensis* foi capaz de modular as principais vias envolvidas no metabolismo hepático, especialmente a gliconeogênese e a lipogênese.

## 8. PERSPECTIVAS

Inúmeros pontos devem ser considerados durante a investigação do extrato de *Ilex paraguariensis* como potencial fitoterápico. Como já salientado, os mecanismos responsáveis pela sua ação ainda contemplam um amplo campo de hipóteses. Também, em virtude de se tratar de um extrato natural, as diferentes frações bioativas que compõem o extrato aquoso podem atuar de maneira individual, sinérgica ou antagônica. Ainda, o estabelecimento da dose mínima necessária para observação dos efeitos seria de muita utilidade para viabilizar sua investigação como candidato nutracêutico. Por fim, o viés de gênero é um tópico muito pertinente e pouco explorado considerando a triagem de fitoquímicos de interesse em saúde.

Diante dessas demandas, o presente estudo apresenta como perspectiva inicial a elucidação do mecanismo de ação das diferentes frações do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, tendo como foco o estabelecimento dose-efeito particular das matesaponinas, ainda pouco exploradas pela comunidade científica. Apropriadamente, esta investigação também contempla o viés de gênero, para que seja evitada uma eventual toxicidade e otimizada a escolha da dose ideal para machos e fêmeas.

Adiante, serão analisados os mecanismos responsáveis pelos efeitos observados no presente estudo. Em se tratando dos resultados na oxidação e síntese de lipídeos observados no estudo de fêmeas estrógeno-deficientes no tecido adiposo branco, serão verificadas vias relacionadas ao metabolismo de lipídeos. A atividade e a expressão dos transportadores de glicose (GLUT-1 e GLUT-4), da proteína de ligação a ácidos graxos da membrana plasmática (FABPpm), da proteína de translocação de ácidos graxos (FAT/CD36) serão alvos iniciais desta investigação.

---

Já em relação aos resultados da lipólise encontrados no tecido adiposo branco visceral de machos, serão verificadas a proteína desacopladora UCP-1 e o receptor adrenérgico  $\beta_3$ , bem como as moléculas envolvidas na mobilização das reservas lipídicas do tecido adiposo, como as perilipinas e a lipase hormônio-sensível.

Considerando os resultados do estudo com fêmeas diabéticas, foi possível concluir que o modelo de diabetes tipo 1 ainda necessita de investigação. Em especial, os níveis de insulina normais são indicativos da necessidade de uma melhor caracterização do modelo em fêmeas. Assim, o efeito da indução do diabetes sobre desfechos clássicos, como a gliconeogênese no fígado, a captação de glicose músculo esquelético, e a produção/secreção de insulina no pâncreas necessitam de nova investigação.

Novamente, os mecanismos envolvidos nos desfechos observados no fígado como consequência do consumo do extrato de *Ilex paraguariensis*, precisam de elucidação, particularmente a contribuição de diferentes substratos para gliconeogênese hepática, bem como a importância da produção aumentada de glicerol, da via da gliceroneogênese, para um fenótipo mais brando do diabetes em fêmeas. Ainda, a contribuição da gliconeogênese renal e da lipólise e gliceroneogênese no tecido adiposo branco também serão focos deste estudo.

Por fim, o efeito do estradiol sobre a susceptibilidade diminuída ao desenvolvimento do diabetes tipo 1 e 2, além dos mecanismos tecido-específicos de proteção deste hormônio diante do insulto por estreptozotocina ou dieta hiperlipídica crônica também compõem as perspectivas deste trabalho.

Em resumo a pesquisa dos efeitos de *Ilex paraguariensis*, assim como seu efeito sexo-dependente, proporciona uma ampla gama de perguntas a serem atendidas tendo como fim a sua aplicabilidade como agente preventivo e/ou terapêutico em diversas disfunções metabólicas de interesse em saúde.

---

## REFERÊNCIAS

- AKIMOTO, L. S. *et al.* Rates of gluconeogenesis in perfused liver of alloxan-diabetic fed rats. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, [S. l.], v. 107(1-2), p. 65–77, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11334372/>
- AL-ACHI, a; GREENWOOD, R. A brief report on some physiological parameters of streptozocin-diabetic rat. **Drug development and industrial pharmacy**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 465–468, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/DDC-100104322>
- ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, [S. l.], v. 15, n. 7, p. 539–553, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S)
- ALEXANDRA DE ANDRADE, Cláudia *et al.* Determination of the phenolic content and evaluation of the antioxidant activity of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy Abr**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 231–235, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200017>
- 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**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 243–250, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-277X.2001.00290.x>
- ARÇARI, Demétrius P. *et al.* Antiobesity effects of yerba maté extract (*ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 2127–2133, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/oby.2009.158>
- ATKINSON, Mark A.; EISENBARTH, George S.; MICHELS, Aaron W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, [S. l.], v. 383, n. 9911, p. 698–82, 2014. Disponível em:

---

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)

BAILEY, C. J.; AHMED-SOROUR, H. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis - Effects on insulin secretion.

**Diabetologia**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 475–481, 1980. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/BF00281829>

BARROS, Rodrigo P. A.; GUSTAFSSON, Jan Åke. Estrogen receptors and the metabolic network. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 289–299, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.005>

BASTOS, D. H. M. *et al.* Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and**

**Biotechnology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 37–46, 2007. Disponível em:

[http://globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0706/MAPSB\\_1\(1\)37-46o.pdf](http://globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0706/MAPSB_1(1)37-46o.pdf)

BELL, Rhonda C. *et al.* Gender differences in the metabolic response to graded numbers of transplanted islets of Langerhans. **Endocrinology**, [S. l.], v. 135, n.

6, p. 2681–2687, 1994. Disponível em:

<https://doi.org/10.1210/endo.135.6.7988458>

BELL, Ronny A. *et al.* Diabetes in non-hispanic white youth. **Diabetes Care**, [S. l.], v. 32, n. Suppl 2, p. S102–S111, 2009. Disponível em:

<https://doi.org/10.2337/dc09-S202>

BIANCHI, V. E.; LOCATELLI, V. Testosterone a key factor in gender related metabolic syndrome. **Obesity Reviews**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 557–575, 2018.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/obr.12633>

BIXBY, Mindy *et al.* Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**, [S. l.], v. 77, n. 3, p. 345–358, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.11.030>

BJÖRNHOLM, M.; ZIERATH, J. R. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: Identifying the defects in Type II diabetes. **Biochemical Society**

**Transactions**, [S. l.], v. 33, n. Pt 2, p. 354–357, 2005. Disponível em:



---

<https://doi.org/10.1042/BST0330354>

BLOHME, G. *et al.* Male predominance of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in young adults: results from a 5-year prospective nationwide study of the 15-34-year age group in Sweden. **Diabetologia**, Germany, v. 35, n. 1, p. 56–62, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf00400852>

BOJIĆ, Mirza *et al.* Determination of flavonoids, phenolic acids, and xanthines in mate tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.). **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, [S. l.], v. 2013, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/658596>

BRACESCO, Nelson *et al.* Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 379–387, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/107555303765551606>

BRIET, Claire *et al.* [Epidemiology of type 1 diabetes and its complications]. **La Revue du praticien**, France, v. 68, n. 6, p. 607–610, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30869246/>

BROWN, E. T. *et al.* Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual neuroscience**, England, v. 22, n. 5, p. 615–618, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0952523805225105>

BUENO, Denise Ribeiro Stort; AZZOLIN, Ione Remiao; PERRY, Marcos Luiz Santos. Ontogenetic study of glucose and lactate utilisation by rat cerebellum slices. **Medical science research**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 631–632, 1994. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Ontogenetic-study-of-glucose-and-lactate-by-rat-Bueno-Azzolin/f4ec4bba5f517f289c7ba0f6cf980edd430b10d1>

BUNIAM, Jariya *et al.* Estrogen and voluntary exercise attenuate cardiometabolic syndrome and hepatic steatosis in ovariectomized rats fed a high-fat high-fructose diet. **American journal of physiology. Endocrinology**

---

**and metabolism**, [S. I.], v. 316, n. 5, p. E908–E921, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00466.2018>

CAHUÊ, Fábio *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**, Canada, v. 42, n. 11, p. 1149–1157, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0213>

CHABROLLE, Christine *et al.* Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [S. I.], v. 6, n. 8, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-11>

CHANDRA, Sonia; DE MEJIA, Elvira Gonzalez. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. I.], v. 52, n. 11, p. 3583–3589, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0352632>

CHAUDHARI, Harmesh N.; KIM, Sang Woo; YUN, Jong Won. Gender-dimorphic regulation of DJ1 and its interactions with metabolic proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of cellular and molecular medicine**, England, v. 19, n. 5, p. 996–1009, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12490>

CHEN, Xinhua; IQBAL, Nayyar; BODEN, Guenther. The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. **Journal of Clinical Investigation**, [S. I.], v. 103, n. 3, p. 365–372, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI5479>

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**, [S. I.], v. 20, n. 12, p. 1168–1175, 2017. Disponível em:

---

<https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3995>

CHUNG, Stephanie T. *et al.* Measurements of gluconeogenesis and glycogenolysis: A methodological review. **Diabetes**, [S. l.], v. 64, n. 12, p. 3996–4010, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db15-0640>

COBAS, Roberta Arnoldi *et al.* The cost of type 1 diabetes: A nationwide multicentre study in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, [S. l.], v. 91, n. 6, p. 434–440, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2471/BLT.12.110387>

COELHO, Geraldo C. *et al.* Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 75–80, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.09.001>

CORTRIGHT, Ronald N. *et al.* Daily exercise reduces fat, protein and body mass in male but not female rats. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 105–111, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00148-0)

CUESTA, Alejandro *et al.* [Acute effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) consumption on heart rhythm in patients referred for Holter study]. **Archivos de cardiologia de Mexico**, Mexico, v. 88, n. 5, p. 468–473, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2018.05.004>

CUMMINS, Timothy D. *et al.* Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity. **AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM**, [S. l.], v. 307, n. 3, p. E262-77, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00271.2013>

CYPESS, Aaron M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **Obstetrical and Gynecological Survey**, [S. l.], v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e3181ac8aa2>

CZENCZEK-LEWANDOWSKA, Ewelina *et al.* Sedentary behaviors in children and adolescents with type 1 diabetes, depending on the insulin therapy used.

---

**Medicine**, United States, v. 98, n. 19, p. e15625, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015625>

DA VEIGA, D. T. A. *et al.* Protective effect of yerba mate intake on the cardiovascular system: A post hoc analysis study in postmenopausal women. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187253>

DARTORA, Nessana *et al.* UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 129, n. 4, p. 1453–1461, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.112>

DAS, A. V; PADAYATTI, P. S.; PAULOSE, C. S. Effect of leaf extract of *Aegle marmelose* (L.) Correa ex Roxb. on histological and ultrastructural changes in tissues of streptozotocin induced diabetic rats. **Indian journal of experimental biology**, INDIA, v. 34, n. 4, p. 341–345, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8698423/>

DAVIS, J. M. *et al.* Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, [S. l.], v. 284, n. 2, p. R399-404, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00386.2002>

DE LOS ANGELES CARRASCO-RUIZ, Maria *et al.* High estradiol differentially affects the expression of the glucose transporter type 4 in pelvic floor muscles of rats. **International Neurourology Journal**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 161–168, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5213/inj.1836116.058>

DE MENESES FUJII, Tatiane Mieko *et al.* Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) modulates NF-kappaB pathway and AKT expression in the liver of rats fed on a high-fat diet. **International journal of food sciences and nutrition**, England, v. 65, n. 8, p. 967–976, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.945153>

DE RESENDE, Pedro Ernesto *et al.* Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 15, p. 440–451, 2015.

---

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.040>

DEEDS, M. C. *et al.* Single dose streptozotocin-induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory Animals**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 131–140, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1258/la.2010.010090>

DEFRONZO, Ralph A.; TRIPATHY, Devjit. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes care**, [S. l.], v. 32 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S157-163, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc09-s302>

DICKEL, Michele Luciane; RATES, Stela Maris Kuze; RITTER, Mara Rejane. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 109, n. 1, p. 60–71, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.003>

DOS SANTOS, Maísa P. *et al.* A Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Increases Fatty Acid Uptake and Reduces Norepinephrine-Induced Lipolysis in Rat Retroperitoneal White Adipose Tissue. **Lipids**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 279–289, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3648-8>

DUPONT, Joëlle; SCARAMUZZI, Rex J. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 473, n. 11, p. 1483–1501, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BCJ20160124>

EISENBARTH, G. S. Update: Update in type 1 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 92, n. 7, p. 2403–2407, 2007.

ENZI, G. *et al.* In vitro effects of glucidamine on adrenergic stimulated lipolysis and on lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. **Pharmacological Research Communications**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 769–774, 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-6989\(86\)90128-1](https://doi.org/10.1016/0031-6989(86)90128-1)

FAY, Jessica V. *et al.* Yerba mate (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.) de novo transcriptome assembly based on tissue specific genomic expression profiles. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 891, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5240-6>

---

FOLCH, Jordi; LEES, M.; STANLEY, G. H. Sloane. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides From Animal Tissues. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9570-9>

GALLAGHER, Dympna *et al.* How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups? **American Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 143, n. 3, p. 228–239, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a008733>

GALLAGHER, Dympna *et al.* Appendicular skeletal muscle mass: Effects of age, gender, and ethnicity. **Journal of Applied Physiology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 229–239, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jappl.1997.83.1.229>

GAMBERO, Alessandra; RIBEIRO, Marcelo L. The positive effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 730–750, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu7020730>

GAMBOA-GÓMEZ, Claudia I. *et al.* Plants with potential use on obesity and its complications. **EXCLI Journal**, [S. l.], v. 14, p. 809–831, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.17179/excli2015-186>

GAN, Ren You *et al.* Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. **Nutrients**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1682, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10111682>

GAO, Hongli *et al.* Aqueous extract of yerba mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. **Phytotherapy Research**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 1225–1231, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.4856>

GAO, Hui *et al.* Genome-wide identification of estrogen receptor  $\alpha$ -binding sites in mouse liver. **Molecular Endocrinology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 10–22, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/me.2007-0121>

GIBB, Fraser *et al.* Aromatase inhibition reduces insulin sensitivity in healthy men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 101, n. 5, p. 2040–2046, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jc.2015-4146>

---

GNOATTO, Simone C. B. *et al.* Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae).

**Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 304–307, 2007. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200012>

GOLDMAN, Jerome M.; MURR, Ashley S.; COOPER, Ralph L. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, [S. l.], v. 80, n. 2, p. 84–97, 2007. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>

<https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>

GOMES, Marilia B. *et al.* Prevalence of adults with type 1 diabetes who meet the goals of care in daily clinical practice: A nationwide multicenter study in Brazil. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 63–70, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.02.008>

<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.02.008>

GONZÁLEZ-MUNIESA, Pedro *et al.* Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 3, p. 17034, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>

<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>

GONZALEZ, A. *et al.* Biological screening of Uruguayan medicinal plants.

**Journal of ethnopharmacology**, IRELAND, v. 39, n. 3, p. 217–220, 1993.

Disponível em: [https://doi.org/doi.org/10.1016/0378-8741\(93\)90040-C](https://doi.org/doi.org/10.1016/0378-8741(93)90040-C)

GONZÁLEZ ARBELÁEZ, Luisa F. *et al.* Effect of an *Ilex paraguariensis* (yerba mate) extract on infarct size in isolated rat hearts: the mechanisms involved.

**Food & function**, England, v. 7, n. 2, p. 816–824, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1039/c5fo01255d>

GOWRI, P. Mangala *et al.* Lipin1 regulation by estrogen in uterus and liver: Implications for diabetes and fertility. **Endocrinology**, [S. l.], v. 148, n. 8, p. 3685–3693, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2006-1728>

<https://doi.org/10.1210/en.2006-1728>

GOYAL, Sameer N. *et al.* Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 244, p. 49–63, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.011>

---

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.032>

GREISING, Sarah M. *et al.* Hormone therapy and skeletal muscle strength: A meta-analysis. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, [S. l.], v. 64A, n. 10, p. 1071–1081, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/gerona/glp082>

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and molecular biology international**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 47–56, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7735139/>

GUO, Xuan *et al.* Panax notoginseng saponins alleviate skeletal muscle insulin resistance by regulating the IRS1–PI3K–AKT signaling pathway and GLUT4 expression. **FEBS Open Bio**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 1008–1019, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12635>

H. M. BASTOS, Deborah *et al.* **Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex Paraguariensis*) leaves**. [S. l.: s. n.]. v. 49E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000400007>

HANHINEVA, Kati *et al.* Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 1365–1402, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms11041365>

HANSEN, Finn Mølgaard; FAHMY, Nibal; NIELSEN, Jens Høiriis. The influence of sexual hormones on lipogenesis and lipolysis in rat fat cells. **Acta Endocrinologica**, [S. l.], v. 95, n. 4, p. 566–570, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/acta.0.0950566>

HANSON, Richard W.; RESHEF, Lea. Glyceroneogenesis revisited. **Biochimie**, [S. l.], v. 85, n. 12, p. 1199–1205, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2003.10.022>

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 72, n. 9, p. R138-151,



---

2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>

HECK, Caleb I.; SCHMALKO, Miguel; DE MEJIA, Elvira Gonzalez. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of Mate teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 18, p. 8394–8403, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf801748s>

HERZIG, S. *et al.* CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. **Nature**, England, v. 413, n. 6852, p. 179–183, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35093131>

HOEKE, Geerte *et al.* Role of Brown Fat in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. **Circulation Research**, [S. l.], v. 118, n. 1, p. 173–182, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306647>

HU, Zhenxia *et al.* Glycogen structure in type 1 diabetic mice: Towards understanding the origin of diabetic glycogen molecular fragility. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 128, p. 665–672, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.186>

HUSSEIN, Ghazi Mohamed Eisa *et al.* Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Promotes Satiety and Body Weight Lowering in Mice: Involvement of Glucagon-Like Peptide-1. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 34, n. 12, p. 1849–1855, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1849>

JACQUES, Rosângela A. *et al.* Influence of agronomic variables on the macronutrient and micronutrient contents and thermal behavior of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 55, n. 18, p. 7510–7516, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf071545g>

JANI, Mahesh S.; TELANG, Shaila D.; KATYARE, Surendra S. Effect of corticosterone treatment on energy metabolism in rat liver mitochondria. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 587–591, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(91\)90317-X](https://doi.org/10.1016/0960-0760(91)90317-X)

JIMENO, Blanca; HAU, Michaela; VERHULST, Simon. Corticosterone levels reflect variation in metabolic rate, independent of ‘stress’. **Scientific Reports**,

---

[S. I.], v. 8, n. 1, p. Published Online, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31258-z>

KAGAMI, Keisuke *et al.* Protective effect of caffeine on streptozotocin-induced beta-cell damage in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. I.], v. 60, n. 9, p. 1161–1165, 2008. Disponível em:

<https://doi.org/10.1211/jpp.60.9.0007>

KANEHISA, H. *et al.* Cross-sectional areas of fat and muscle in limbs during growth and middle age. **International Journal of Sports Medicine**, [S. I.], v. 15, n. 7, p. 420–425, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2007-1021081>

KARASTERGIOU, Kalypso *et al.* Sex differences in human adipose tissues - The biology of pear shape. **Biology of Sex Differences**, [S. I.], v. 3, n. 13, p. Published Online, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2042-6410-3-13>

KARASTERGIOU, Kalypso; FRIED, Susan K. Cellular mechanisms driving sex differences in adipose tissue biology and body shape in humans and mouse models. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. I.], v. 1043, p. 29–51, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_3)

KARL, I. E.; GARBER, A. J.; KIPNIS, D. M. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. III. Dietary and hormonal regulation. **Journal of Biological Chemistry**, [S. I.], v. 251, n. 3, p. 844–850, 1976.

KAWAKAMI, Mizuho *et al.* Estrogen replacement enhances insulin-induced as160 activation and improves insulin sensitivity in ovariectomized rats.

**American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [S. I.], v. 315, n. 6, p. E1296-1304, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00131.2018>

KIEFER, Florian W. Browning and thermogenic programming of adipose tissue. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. I.], v. 30, n. 4, p. 479–485, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.09.003>

KIM, Sun Young *et al.* Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*):

---

A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 338, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0859-1>

KISHORE, Preeti *et al.* Role of hepatic glycogen breakdown in defective counterregulation of hypoglycemia in intensively treated type 1 diabetes. **Diabetes**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 659–666, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.03.06.db05-0849>

KOLOVOU, Genovefa D. *et al.* Review: Apolipoprotein E gene polymorphism and gender. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 120–133, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19429797/>

LAFONTAN, Max; LANGIN, Dominique. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Progress in Lipid Research**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 275–297, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>

LANGIN, Dominique. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 53, n. 6, p. 482–491, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.03.009>

LARSEN, Britta A. *et al.* Association of muscle mass, area, and strength with incident diabetes in older adults: The Health ABC Study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 101, n. 4, p. 1847–1855, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3643>

LASOTA, A.; DANOWSKA-KLONOWSKA, D. Experimental osteoporosis--different methods of ovariectomy in female white rats. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)**, [S. l.], v. 49, n. Suppl 1, p. 129–131, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15638397/>

LE MAY, C. *et al.* Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 103, n. 24, p. 9232–9237, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0602956103>

LECHNER, O. *et al.* Altered circadian rhythms of the stress hormone and

---

melatonin response in lupus-prone MRL/MP-fa(lpr) mice. **Journal of Autoimmunity**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 325–333, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0375>

LEE, Jaewang *et al.* Poorly-Controlled Type 1 Diabetes Mellitus Impairs LH-LHCGR Signaling in the Ovaries and Decreases Female Fertility in Mice. **Yonsei medical journal**, [S. l.], v. 60, n. 7, p. 667–678, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3349/ymj.2019.60.7.667>

LI, Yunxia *et al.* Preventative effects of resveratrol and estradiol on streptozotocin-induced diabetes in ovariectomized mice and the related mechanisms. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. e0204499, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204499>

LIMA, Natália Da Silva *et al.* Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. **Life Sciences**, [S. l.], v. 115, n. 1–2, p. 29–35, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.003>

LIVINGSTONE, Callum; COLLISON, Mary. Sex steroids and insulin resistance. **Clinical Science**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 151–166, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/CS20010197>

LU, Jian Mei *et al.* Antidiabetic effect of total saponins from *Polygonatum kingianum* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 179, p. 291–300, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.057>

LUCIER, Jessica; WEINSTOCK, Ruth S. Diabetes Mellitus Type 1. *In*: Treasure Island (FL): [s. n.], 2019. p. StatPearls. *E-book*.

LUZ, Ana Beatriz Gobbo *et al.* The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 36, p. 165–172, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.027>

MARTINET, A. *et al.* NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical Analysis**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 48–52,

---

2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1099-1565\(200101/02\)12:1<48::AID-PCA560>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1099-1565(200101/02)12:1<48::AID-PCA560>3.0.CO;2-#)

MAUVAIS-JARVIS, Franck. Epidemiology of Gender Differences in Diabetes and Obesity. **Advances in experimental medicine and biology**, United States, v. 1043, p. 3–8, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_1)

MERZOUK, H. *et al.* Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Clinical science (London, England : 1979)**, [S. l.], v. 98, n. 1, p. 21–30, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/cs0980021>

MESSINA, Diego *et al.* Lipid-lowering effect of mate tea intake in dyslipidemic subjects. **Nutricion Hospitalaria**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 2131–2139, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.5.8386>

MITRAKOU, A. *et al.* Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. **The New England journal of medicine**, UNITED STATES, v. 326, n. 1, p. 22–29, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM199201023260104>

MORIMOTO, Sumiko *et al.* Insulin gene expression pattern in rat pancreas during the estrous cycle. **Life Sciences**, [S. l.], v. 68, n. 26, p. 2979–2985, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01100-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01100-6)

MURAKAMI, Aureanna Nairne Negrão *et al.* Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 141, n. 1, p. 60–65, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.119>

NADAL-CASELLAS, Antònia *et al.* Sex-dependent differences in rat hepatic lipid accumulation and insulin sensitivity in response to diet-induced obesity. **Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 164–172, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/o11-069>

NALLY, Laura M. *et al.* Pharmacologic treatment options for type 1 diabetes: what's new? **Expert Review of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 12, n. 5, p.

---

471–479, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1597705>

NEWELL-FUGATE, A. E. The role of sex steroids in white adipose tissue adipocyte function. **Reproduction**, [S. l.], v. 153, n. 4, p. E133–E149, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep-16-0417>

NICHOLSON, Christopher J. *et al.* Estrogenic vascular effects are diminished by chronological aging. **Scientific Reports**, [S. l.], 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12153-5>

PALMISANO, Brian T.; ZHU, Lin; STAFFORD, John M. Role of estrogens in the regulation of liver lipid metabolism. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*. [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_12)

PAMPLONA MOSIMANN, Ana Luiza; WILHELM-FILHO, Danilo; DA SILVA, Edson Luiz. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 59–70, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biof.5520260106>

PANG, Jisook; CHOI, Youngshim; PARK, Taesun. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 476, n. 2, p. 178–185, 2008. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.019>

PARK, Young-Min *et al.* Effects of ovariectomy and intrinsic aerobic capacity on tissue-specific insulin sensitivity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, United States, v. 310, n. 3, p. E190-9, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00434.2015>

PATTERSON, C. C. *et al.* Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: Evidence of non-uniformity over time in rates of increase. **Diabetologia**, [S. l.], v. 55, n. 8, p. 2142–2147, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2571-8>

PATTERSON, Christopher C. *et al.* Incidence trends for childhood type 1

---

diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **The Lancet**, [S. l.], v. 373, n. 9680, p. 2027–2033, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60568-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60568-7)

PEREIRA, D. F. *et al.* Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 19, n. 10, p. 868–877, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.05.008>

PÉREZ-NIEVAS, B. G. *et al.* Corticosterone as a marker of susceptibility to oxidative/nitrosative cerebral damage after stress exposure in rats. **Psychoneuroendocrinology**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 703–711, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.04.011>

PHILLIPS, S. K. *et al.* Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. **Clinical Science**, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 95–98, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/cs0840095>

PICOZZI, A.; DELUCA, F. Depression and glycemic control in adolescent diabetics: evaluating possible association between depression and hemoglobin A1c. **Public Health**, [S. l.], v. 170, p. 32–37, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2019.02.005>

PIMENTEL, Gustavo D. *et al.* Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 809–818, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.04.016>

PODAR, Toomas *et al.* Mortality in patients with childhood-onset type 1 diabetes in Finland, Estonia, and Lithuania: Follow-up of nationwide cohorts. **Diabetes Care**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 290–294, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diacare.23.3.290>

PUAH, Jennifer A.; BAILEY, Clifford J. Effect of ovarian hormones on glucose metabolism in mouse soleus muscle. **Endocrinology**, [S. l.], v. 117, n. 4, p.

---

1336–1340, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo-117-4-1336>

REDIG, Amanda J.; MUNSHI, Hidayatullah G. Care of the Cancer Survivor: Metabolic Syndrome after Hormone-Modifying Therapy. **American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 123, n. 1, p. 81.e1., 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.06.022>

RENARD, Eric. [New modes of insulin delivery and new modes of monitoring of type 1 diabetes mellitus]. **La Revue du praticien**, France, v. 68, n. 6, p. 620–627, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30869250/>

RESENDE, Pedro Ernesto 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**, [S. l.], v. 144, n. 3, p. 735–740, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.023>

RESENDE, Marcos Deon Vilela *et al.* Programa de melhoramento da Erva-Mate coordenado pela EMBRAPA - Resultados da avaliação genética de populações, progênes, indivíduos e clones. **Colombo: Embrapa Florestas**, [S. l.], v. 43, p. 65, 2000. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/23030/1/circ-tec43.pdf>

RIACHI, Liza Ghassan *et al.* Effect of light intensity and processing conditions on bioactive compounds in maté extracted from yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Food Chemistry**, [S. l.], v. 266, p. 317–322, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.028>

ROCHA, Debora Santos *et al.* Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, France, v. 105, p. 370–376, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.132>

RYAN, Alice S.; NICKLAS, Barbara J.; BERMAN, Dora M. Hormone replacement therapy, insulin sensitivity, and abdominal obesity in postmenopausal women. **Diabetes care**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 127–133, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diacare.25.1.127>



---

SAHA, Joy K. *et al.* Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, England, v. 230, n. 10, p. 777–784, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/153537020523001012>

SANDIKCI, Mustafa; KARAGENC, Levent; YILDIZ, Mustafa. Changes in the Pancreas in Experimental Diabetes and the Effect of Lycopene on These Changes: Proliferating, Apoptotic, and Estrogen Receptor  $\alpha$  Positive Cells. **Anatomical Record**, [S. l.], 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ar.23641>

SANDIKCI, Mustafa; KARAGENC, Levent; YILDIZ, Mustafa. Changes in the Pancreas in Experimental Diabetes and the Effect of Lycopene on These Changes: Proliferating, Apoptotic, and Estrogen Receptor  $\alpha$  Positive Cells. **Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)**, United States, v. 300, n. 11, p. 2000–2007, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ar.23641>

SATO, Junko; NASU, Masahiro; TSUCHITANI, Minoru. Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 155–162, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0021>

SCHNEDL, W. J. *et al.* STZ transport and cytotoxicity: Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**, [S. l.], v. 43, n. 11, p. 1326–1333, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diabetes.43.11.1326>

SELMA, María V.; ESPÍN, Juan C.; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 15, p. 6485–6501, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf902107d>

SILVA, Raquel D. Agostin. *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**, [S. l.], v. 82, n. 6, p. 818–826, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.04.011>

---

SINCLAIR, C. J. D.; GEIGER, J. D. Caffeine use in sports. A pharmacological review. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 71–79, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10822912/>

SIRMANS, Susan M.; PATE, Kristen A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. **Clinical Epidemiology**, [S. l.], v. 6, p. 1–13, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/clep.s37559>

SOLTESZ, Gyula; PATTERSON, C. C.; DAHLQUIST, G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence - What can we learn from epidemiology? **Pediatric Diabetes**, [S. l.], v. 6, p. 6–14, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2007.00324.x>

SPRIET, L. L. Caffeine and performance. **International journal of sport nutrition**, UNITED STATES, v. 5 Suppl, p. S84-99, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1123/ijasn.5.s1.s84>

STRASSMANN, Betina B. *et al.* Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of agricultural and food chemistry**, United States, v. 56, n. 18, p. 8348–8353, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf801041f>

STUNKARD, Albert J. Current views on obesity. **American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 230–236, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(97\)89464-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)89464-8)

TANCRÈDE, G.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Long-term changes in the diabetic state induced by different doses of streptozotocin in rats. **British journal of experimental pathology**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 117–123, 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6221747>

TEPAVCEVIC, S. *et al.* Interaction between insulin and estradiol in regulation of cardiac glucose and free fatty acid transporters. **Hormone and Metabolic Research**, [S. l.], v. 43, n. 8, p. 524–530, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280784>

THAEOMOR, Atcharaporn *et al.* Perinatal taurine supplementation prevents

---

metabolic and cardiovascular effects of maternal diabetes in adult rat offspring. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 975, p. 295–305, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2\\_26](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2_26)

TORRES, I. L. *et al.* Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 111–116, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000100013>

VAGUE, J. La differentiation sexuelle facteur determinant des formes de l'obesite. **Presse Medicale**, [S. l.], v. 55, n. 30, p. 339, 1947. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1996.tb00535.x>

VALENCAK, Teresa G.; OSTERRIEDER, Anne; SCHULZ, Tim J. Sex matters: The effects of biological sex on adipose tissue biology and energy metabolism. **Redox biology**, Netherlands, v. 12, p. 806–813, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.012>

VALITSKY, Michael *et al.* Insulin sensitizer prevents and ameliorates experimental type 1 diabetes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 313, n. 6, p. E672–E680, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00329.2016>

VALITSKY, Michael *et al.* Insulin sensitizer prevents and ameliorates experimental type 1 diabetes. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, United States, v. 313, n. 6, p. E672–E680, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00329.2016>

VAN DAM, Andrea D. *et al.* Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 816, p. 82–92, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.03.051>

VÁZQUEZ-PALACIOS, G. *et al.* Further definition of the effect of corticosterone on the sleep-wake pattern in the male rat. **Pharmacology Biochemistry and**

---

**Behavior**, [S. I.], v. 70, n. 2–3, p. 305, 2001. Disponível em:  
[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00620-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00620-7)

VILLA, Alessandro *et al.* Tetradian oscillation of estrogen receptor  $\alpha$  is necessary to prevent liver lipid deposition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. I.], v. 109, n. 29, p. 11806–11811, 2012. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1205797109>

VITAL, Paz; LARRIETA, Elena; HIRIART, Marcia. Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. **Journal of Endocrinology**, [S. I.], v. 190, n. 2, p. 425–432, 2006. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1677/joe.1.06596>

WAGLE, Shreepad R.; INGEBRETSEN, William R.; SAMPSON, Linda. Studies on gluconeogenesis and stimulation of glycogen and protein synthesis in isolated hepatocytes in alloxan diabetic, normal fed and fasted animals. **Acta Diabetologica Latina**, [S. I.], v. 12, p. 185–198, 1975. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1007/BF02581299>

WARD, D. T. *et al.* Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, [S. I.], v. 12, n. 4, p. 779–790, 2001. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11274239/>

WESTWOOD, F. Russell. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicologic Pathology**, [S. I.], v. 36, n. 3, p. 375–384, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>

WHITE, Ursula A.; TCHOUKALOVA, Yourka D. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [S. I.], v. 1842, n. 3, p. Published Online, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.006>

WILLIAMS, Christine M. Lipid metabolism in women. **The Proceedings of the Nutrition Society**, England, v. 63, n. 1, p. 153–160, 2004. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1079/PNS2003314>

---

WINNICK, Jason J. *et al.* Hepatic glycogen can regulate hypoglycemic counterregulation via a liver-brain axis. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 126, n. 6, p. 2236–2248, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI79895>

YAMADA, Yutaka; NAKAZATO, Yoshikazu; OHGA, Akira. The mode of action of caffeine on catecholamine release from perfused adrenal glands of cat. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 351–356, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb12603.x>

ZHU, Lin *et al.* Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. **Diabetes**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 424–434, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/db11-1718>

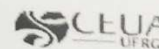
ZUCKER, Irving; BEERY, Annaliese K. Males still dominate animal studies. **Nature**, [S. l.], v. 465, n. 7299, p. 690, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/465690a>



UFRGS  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



### CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 31500

Título:

EFEITO DO TRATAMENTO COM ERVA-MATE SOBRE O METABOLISMO DOS TECIDOS MUSCULAR E HEPÁTICO DE RATAS DIABÉTICAS E SOBRE O METABOLISMO DO TECIDO ADIPOSEO DE RATOS MACHOS, FEMEAS E FEMEAS OVARIETOMIZADAS

Vigência: 01/07/2016 à 30/04/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LUIZ CARLOS RIOS KUCHARSKI - coordenador desde 01/07/2016  
VANESSA SCHEIN - pesquisador desde 01/07/2016  
JÉSSICA MASCHIO - Outra Função desde 01/07/2016  
DEBORA SANTOS ROCHA - Aluno de Doutorado desde 01/07/2016  
Maiza Cristina Von Dentz - Aluno de Mestrado desde 01/07/2016

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 11/07/2016 - SALA 323 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 122 ratos machos e fêmeas Wistar da espécie Rattus norvegicus, sendo 100 fêmeas e 22 machos, com 60 dias de idade, provenientes do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Sexta-Feira, 29 de Julho de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética

---

## ANEXO II

### Aceite da Revista Journal of Traditional and Complementary Medicine

#### Your manuscript EJTCM\_2020\_98\_R1 has been accepted



**De**                   Ciro Isidoro (Journal of Traditional and Complementary Medicine) <EvisSupport@elsevier.com>  
**Para**                   <debor.rocha@ufrgs.br>  
**Responder p...**    <ciro.isidoro@med.uniupo.it>  
**Data**                2020-07-16 02:37

Ref: EJTCM\_2020\_98\_R1

Title: Adipose tissue of female Wistar rats respond to Ilex paraguariensis treatment after ovariectomy surgery

Journal: Journal of Traditional and Complementary Medicine

Dear Ms. Santos Rocha,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. My own comments as well as any reviewer comments are appended to the end of this letter.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department. We will create a proof which you will be asked to check. You can read more about this [here](#). Meanwhile, you will be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact.

Thank you for submitting your work to Journal of Traditional and Complementary Medicine. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Ciro Isidoro  
Editor in chief  
Journal of Traditional and Complementary Medicine

#### Comments from the editors and reviewers:

**Thanks for revising the ms in a satisfactory manner. Happy to accept it.**

#### Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

---

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.